

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FILLEMON EDILLYN DA SILVA BAMBIRRA ALVES

HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO:
CONDIÇÕES DE PROCESSO, PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS,
ANTIOXIDANTES E FUNCIONAIS

CURITIBA

2018

FILLEMONT EDILLYN DA SILVA BAMBIRRA ALVES

HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO:
CONDIÇÕES DE PROCESSO, PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS,
ANTIOXIDANTES E FUNCIONAIS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosemary Hoffmann Ribani

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Agnes de Paula Scheer

CURITIBA

2018

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

A 474h

Alves, Fillemon Edillyn da Silva Bambilra
Hidrolisado enzimático de farinha de sangue de frango: condições de processo, propriedades físico-químicas, antioxidantes e funcionais / Fillemon Edillyn da Silva Bambilra Alves. – Curitiba, 2018.

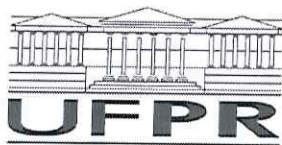
Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2018.

Orientadora: Rosemary Hoffmann Ribani - Coorientadora: Agnes de Paula Scheer . -

1. Peptídeos. 2. Antioxidantes. 3. Farinha de sangue de frango. I. Universidade Federal do Paraná. II. Ribani, Rosemary Hoffmann . III. Scheer, Agnes de Paula. IV. Título.

CDD: 660.634

Bibliotecária: Vanusa Maciel - CRB - 9/1928



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **FILLEMOM EDILLYN DA SILVA BAMBIRRA ALVES** intitulada: **HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO: CONDIÇÕES DE PROCESSO, PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, ANTIOXIDANTES E FUNCIONAIS**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 10 de Agosto de 2018.

ROSEMARY HOFFMANN RIBANI

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE

Avaliador Externo (UFPR)

LUANA CAROLINA BOSMULER ZÜGE

Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço às minhas professoras orientadoras, professora Rosemary e professora Agnes, pelo tempo dedicado, pelo conhecimento transmitido, pela confiança depositada, pelas palavras motivadoras e pela grande receptividade quanto à ideia proposta para este projeto de pesquisa. Obrigado por tudo durante todos esses anos que vão além desses dois últimos no Mestrado, mas que também dizem respeito aos anos da graduação.

Agradeço às professoras Luciana Vandenberghe e Luana Bosmuler Züge por fazerem parte da banca e por suas contribuições ao trabalho com sua visão, conhecimento e experiência. Também agradeço ao professor Vítor Renan da Silva e à professora Michele Rigon Spier por sua participação no meu exame de Qualificação, enriquecendo muito a proposta do trabalho apresentada na ocasião.

Agradeço ao engenheiro que providenciou a matéria-prima utilizada nesse trabalho, pois sem isso nada teria sido possível. A seu pedido, estou mantendo seu nome e empresa onde trabalha em sigilo, mas sempre me lembrarei com gratidão de sua atitude ao compreender as dificuldades para conseguir esse tipo de material para pesquisa e por ter sido muito solícito.

Agradeço aos colegas e amigos do grupo Bioativos, em especial o Gerson e a Danielle, que participaram de forma muito valiosa na preparação do artigo e me ensinaram muitas coisas importantes, além de me motivarem muito para chegar até o fim desta etapa. Agradeço também à Suélen, que, junto com o Gerson, participou ativamente na preparação do trabalho enviado para o Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CBCTA) de 2018 e também por seu conhecimento. Também agradeço à Polyanna pelas inúmeras dicas e contatos que tornaram possível a realização de muitas análises feitas para este trabalho e à Rafaela, pela amizade e, junto com a Suélen, estar cuidando das análises de propriedades antioxidantes no grupo.

Agradeço aos colegas e amigos do grupo Emultec por toda a amizade e a ajuda. Ao Klayton, pela amizade que vem desde o começo da graduação e por todas as dicas importantes para as disciplinas no Mestrado. À Aline, Madeline, Raquel e Luíza pelos trabalhos que fizemos juntos para o Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ERSCTA) e o Simpósio Paranense de Modelagem, Simulação e Controle de Processos (Simproc). Agradeço também à Danielli e à

Isabel pela amizade e por toda a ajuda no laboratório, e à Giovana, pela amizade que também começou na graduação e pelo companheirismo durante as disciplinas do Mestrado.

Agradeço à Isabela pela participação naquele trabalho para o ERSCTA e pela ajuda imprescindível ao ter me fornecido os contatos de todos os abatedouros da região Sul do Brasil. Com as dificuldades que estava enfrentando, certamente não teria sido possível conseguir a matéria-prima para o trabalho sem essa ajuda.

Agradeço à Elaine, por suas dicas muito importantes quanto ao estudo de proteínas e por ter me passado contatos importantíssimos para análises fundamentais para este trabalho.

Agradeço às doutorandas do Programa de Pós Graduação em Ciências – Bioquímica da UFPR, Ana Caroline e Heloísa, por sua imensa contribuição ao trabalho com a eletroforese em gel e com a espectroscopia de dicroísmo circular.

Agradeço ao professor Carlos Itsuo Yamamoto por ter disponibilizado a análise de minerais no Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos (LACAUT), o que foi muito importante para complementar os resultados de análise da composição química da matéria-prima utilizada neste trabalho.

Agradeço a todos os técnicos e funcionários da UFPR por sua prestatividade e importante contribuição para este trabalho: Paulo, Luis e Carlos (Secretaria do PPGEAL), Marcelo (Laboratório de Química Analítica Aplicada), Jair (Laboratório de Análise de Alimentos), Andreia e Patrícia (Central Analítica da Engenharia Química), Maurício e Maria da Graça (Central Analítica da Farmácia), Walderson (Laboratório de Cerâmica), Wanderlei (Laboratório de Tecnologia de Alimentos), Cintia (LACAUT), Grazielli (Laboratório de Espectroscopia de Infravermelho), ao Departamento de Química e a Central de Produtos Químicos, assim como toda a equipe do Centro de Microscopia Eletrônica.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa recebida e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento ao projeto.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos pela oportunidade de continuar a aprender para crescer.

A todos vocês, um grande e sincero:
Muito obrigado.

“Não se pode banhar-se duas vezes no mesmo rio.”

Heráclito de Éfeso

RESUMO

Sangue de frango é um subproduto de abatedouro rico em proteína, geralmente transformado em farinha de sangue para ser incorporado em rações. No entanto, esse alto conteúdo de proteína somado aos seus elevados níveis de ferro indica que esse material pode ter destinos mais nobres. Esse subproduto tem o potencial de ser utilizado em suplementação, bem como pode ser hidrolisado, buscando a obtenção de peptídeos com interessantes propriedades funcionais e bioativas. Enquanto o sangue de outros animais tem sido estudado dentro desse tema, uma investigação das propriedades de interesse do sangue de frango para a indústria de alimentos também se faz necessária. Nesse sentido, o presente trabalho apresenta um estudo das condições de processo da proteólise da farinha de sangue de frango (FSF) e das propriedades funcionais e antioxidantes de seus hidrolisados (HFSF). O efeito da temperatura, do pH e da concentração de enzima no grau de hidrólise (GH) foi avaliado utilizando o planejamento experimental de Doehlert. Um modelo estatístico foi usado para prever as condições resultantes no máximo GH. FSF é rica em proteína (93,42%) e ferro (1.290,28 mg/kg). Amostras de HFSF nas condições ótimas com diferentes GH de acordo com a duração da reação: 60 (22,6%), 90 (24,5%) e 120 min (29,7%). Todos os hidrolisados tiveram massa molecular inferior a 14,4 kDa, conteúdo de heme crescente e correlacionado com os parâmetros de cor dos pós de HFSF, tendência em formar agregados higroscópicos com diâmetro decrescente e, em comparação com a FSF, maior estabilidade térmica. Espectrometria de absorção no ultravioleta, espectroscopia no infravermelho e dicroísmo circular confirmaram as mudanças conformacionais nos HFSF e um aumento no número de terminais N e C em função do GH. De acordo com o GH, comparadas à FSF, as amostras de HFSF tiveram melhor capacidade de retenção de óleo que diminuiu com o GH (1,26–2,55 mL/g). Comparado à proteína isolada de soja, as espumas de HFSF exibiram melhor comportamento em pH neutro, com espumabilidade crescente (52,1–170,8%), mas estabilidade decrescente (variando de 21,9 a 58,1%). Enquanto isso, emulsões de HFSF apresentaram baixa atividade emulsificante (34.21–41.39 m²/g) e estabilidade superior, porém decrescente (variando de 28,56 a 77,74 min). O tratamento enzimático resultou em hidrolisados com atividade antioxidante. Foi verificado que a atividade FRAP é prejudicada pela extensão da hidrólise, enquanto o HFSF obtido com 90 min de reação apresentou as melhores capacidades de sequestro dos radicais ABTS e DPPH (58,40 e 85,99 µmol TE/g, respectivamente). Esses resultados indicam que o HFSF é um potencial ingrediente para a indústria de alimentos com propriedades funcionais e antioxidantes, e que o controle rigoroso do processo é imperativo para ajustar o GH que resulte em hidrolisados com as características desejadas.

Palavras-chave: subproduto de abatedouro; peptídeos; grau de hidrólise; propriedades emulsificantes; propriedades de espuma; propriedades antioxidantes.

ABSTRACT

Chicken blood is a slaughterhouse by-product rich in protein commonly transformed into blood meal to be used as animal food. However, having high protein content and high iron levels indicates that this material possibly has better uses. This by-product has the potential to be used in supplementation and hydrolyzed as well, aiming for the obtaining of peptides having interesting functional and bioactive properties. While blood from other animals is being studied within this subject, an investigation of the chicken blood properties of interest for the food industry is necessary as well. In this sense, this work presents a study of the process conditions of proteolysis of chicken blood meal (CBM) and the functional and bioactive properties of its hydrolysates (CBMH). The effect of the temperature, pH and enzyme concentration in the degree of hydrolysis (DH) was assessed using the Doehlert experimental design. A statistical model was used to predict the conditions resulting in the maximal DH. CBM is rich in protein (93.42%) and iron (1290.28 mg/kg). CBMH samples were prepared at optimal conditions with different DH values according to the hydrolysis duration: 60 (22.6%), 90 (24.5%) and 120 min (29.7%). All hydrolysates had a molecular weight lower than 14.4 kDa, increasing heme content correlated with the color parameters of CBMH powders, tendency to form hygroscopic aggregates with decreasing diameter and higher thermal stability than CBM. UV absorption spectroscopy, infrared spectroscopy and circular dichroism confirmed the conformational changes in CBMH and an increase in N and C terminals in function of the DH. According to their DH, compared to CBM, CBMH samples had enhanced oil holding capacity that decreased with the DH (1.26–2.55 mL/g). Compared to soy protein isolate, CBMH foams exhibited better behavior at neutral pH, with increasing foam capacity (52.1–170.8%), but decreasing foam stability (ranging from 21.9 to 58.1%). Meanwhile, CBMH emulsions displayed low emulsifying activity (34.21–41.39 m²/g) and higher but decreasing emulsifying stability (ranging from 28.56 to 77.74 min). The enzymatic process resulted in hydrolysates displaying antioxidant properties. The FRAP activity was found to be impaired with the extension of hydrolysis, while the CBMH obtained after 90 min of hydrolysis displayed the best overall ABTS and DPPH scavenging abilities (58.40 e 85.99 μ mol TE/g, respectively). These results indicate that CBMH is a potential ingredient for the food industry with functional and antioxidant properties and that the rigorous control of the process conditions is imperative to adjust the DH in order to obtain hydrolysates with the desired characteristics.

Keywords: slaughterhouse by-product; peptides; degree of hydrolysis; emulsifying properties; foaming properties; antioxidant properties.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PRODUÇÃO DE PROTEÍNA ANIMAL NO BRASIL EM 2008.	19
FIGURA 2 – RANKING PRODUÇÃO DE FRANGOS DE CORTE NO BRASIL.....	20
FIGURA 3 – ABATES DE FRANGO NO PARANÁ NA ÚLTIMA DÉCADA.	20
FIGURA 4 – RESÍDUOS E SUBPRODUTOS RESULTANTES DAS ETAPAS DO PROCESSAMENTO AVÍCOLA.....	24
FIGURA 5 – ESTRUTURA DA PEPTIDASE S08.001: SUBTILISINA CARLSBERG COM A TRÍADE CATALÍTICA DESTACADA EM MODELO DE BOLAS E VARETAS.	27
FIGURA 6 – PERFIS DE GRAU DE HIDRÓLISE E SUA DERIVADA OBTIDOS PELO MÉTODO PH-STAT COM HIDRÓLISE EM DIFERENTES TEMPERATURAS E CONCENTRAÇÕES DE ENZIMA.	47
FIGURA 7 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS PH-STAT E OPA PARA A DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE.	48
FIGURA 8 – RESULTADOS DA HIDRÓLISE DA FARINHA DE SANGUE DE FRANGO NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE PROCESSO.....	51
FIGURA 9 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DAS AMOSTRAS DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO (FSF) E DE SEUS HIDROLISADOS (HFSF).	54
FIGURA 10 – TERMOGRAMAS DA PERDA DE MASSA E A DERIVADA DO PERFIL TERMOGRAVIMÉTRICO DE AMOSTRAS DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO (FSF) E SEUS HIDROLISADOS (HFSF).....	56
FIGURA 11 – RESULTADOS DAS ANÁLISES ESPECTROMÉTRICAS DE AMOSTRAS DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO (FSF) E DE SEUS HIDROLISADOS (HFSF).....	58
FIGURA 12 – PROPRIEDADES DE ESPUMA E PROPRIEDADES EMULSIFICANTES DOS HIDROLISADOS DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO (FSF) E DA PROTEÍNA DE SOJA (PIS).....	63
FIGURA 13 – MICROGRAFIAS SELECIONADAS (AMPLIAÇÃO DE 160×) E DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO DE GOTAS (DDG) DE EMULSÕES O/A PREPARADAS COM HIDROLISADOS DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO (HFSF) E PROTEÍNA DE SOJA (PIS).	66

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO.....	22
QUADRO 2 – PARÂMETROS DO EFLUENTE DE ABATE E PROCESSAMENTO DE AVES.	24
QUADRO 3 – PEPTÍDEOS E HIDROLISADOS DE PROTEÍNA: PROPRIEDADES FUNCIONAIS E CARACTERÍSTICAS RESULTANTES DE SUA APLICAÇÃO.....	31
QUADRO 4 – EXEMPLOS DE APLICAÇÕES DE ACORDO COM CARACTERÍSTICAS ESPERADAS DE PEPTÍDEOS E HIDROLISADOS DE PROTEÍNA.....	32

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE DOEHLERT COM 3 FATORES PARA A HIDRÓLISE DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO POR ALCALASE®.....	38
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E MINERAL DA FARINHA DE SANGUE DE FRANGO LIOFILIZADA.	45
TABELA 3 – RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE DOEHLERT PARA A HIDRÓLISE DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO.....	48
TABELA 4 – PARÂMETROS E COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO ESTATÍSTICO PARA DESCREVER O GH_{OPA} NA HIDRÓLISE DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO (FSF) POR ALCALASE® OBTIDO COM BASE NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE DOEHLERT.....	49
TABELA 5 – GRAU DE HIDRÓLISE OBTIDO PELO MÉTODO DO ORTOFTALDIALDEÍDO (GH_{OPA}) E PARÂMETROS DE COR DO ESPAÇO CIE LAB PARA HIDROLISADOS (HFSF) OBTIDOS APÓS 60, 90 E 120 MIN DE HIDRÓLISE.	53
TABELA 6 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE OS PARÂMETROS DE COR DE HIDROLISADOS DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO (HFSF) E O CONTEÚDO DE HEME LIBERADA DURANTE A HIDRÓLISE, O GRAU DE HIDRÓLISE (GH) E A DURAÇÃO DA HIDRÓLISE.	53
TABELA 7 – CONFORMAÇÃO ESTRUTURAL DA FARINHA DE SANGUE DE FRANGO (FSF) E DE SEUS HIDROLISADOS (HFSF) A PARTIR DE DADOS DE DICROÍSMO CIRCULAR (DC).....	59
TABELA 8 – POTENCIAIS ANTIOXIDANTES DOS HIDROLISADOS E COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE PEARSON COM VARIÁVEIS DE PROCESSO.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ABIEC	- Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
ABPA	- Associação Brasileira de Proteína Animal
ABTS	- ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico)
ANOVA	- Análise de variância
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEMA	- Conselho Estadual do Meio Ambiente
CONAMA	- Conselho Nacional do Meio Ambiente
DDG	- Distribuição de Diâmetro de Gotas
DC	- Dicroísmo circular
DPPH	- Radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DRIFTS	- Espectroscopia por refletância difusa no infravermelho médio com transformada de Fourier
EC/IUBMB	- Comitê de Enzimas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FSF	- Farinha de sangue de frango
FTIR	- Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GH	- Grau de hidrólise
HFSF	- Hidrolisado de farinha de sangue de frango
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
OMS	- Organização Mundial da Saúde
OPA	- Ortoftaldialdeído
PIS	- Proteína isolada de soja
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SINDIAVIPAR	- Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná
TGA	- Análise termogravimétrica
TPTZ	- 2,4,6-tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina
DTG	- Termogravimetria derivada
USDA	- United States Department of Agriculture

LISTA DE SÍMBOLOS

A	– Absorbância (no comprimento de onda indicado no subscrito)
a^*	– Variável do eixo verde-vermelho no espaço de cor CIE Lab
a_0, a_i, a_{ii}, a_{ij}	– Coeficientes do modelo estatístico
ABTS	– Atividade antioxidante de captura do radical ABTS ($\mu\text{mol TE/g}$)
B	– Consumo de base durante a hidrólise (mL)
b^*	– Variável do eixo azul-amarelo no espaço de cor CIE Lab
C^*	– Croma no espaço de cor CIE Lab
CE	– Capacidade de espuma ou espumabilidade (%)
CRO	– Capacidade de retenção de óleo (g/g ou mL/g)
d	– Fator de diluição da amostra
DPPH	– Atividade antioxidante de captura do radical DPPH ($\mu\text{mol TE/g}$)
E/S	– Razão mássica de enzima/substrato
EE	– Estabilidade da espuma (%)
F	– Fração volumétrica de óleo usada na preparação das emulsões
FRAP	– Atividade antioxidante de redução do íon Fe(III) ($\mu\text{mol TE/g}$)
GH_{OPA}	– Grau de hidrólise determinado pelo método do OPA (%)
$\text{GH}_{\text{pH-Stat}}$	– Grau de hidrólise determinado pelo método pH-Stat (%)
h	– Número médio de ligações peptídicas clivadas
h°	– Ângulo de tonalidade no espaço de cor CIELAB
h_{tot}	– Número médio de ligações peptídicas no substrato
IAE	– Índice de atividade emulsificante ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)
IEE	– Índice de estabilidade da emulsão (min)
L^*	– Luminosidade no espaço de cor CIELAB
m	– Massa (g)
MM	– Massa molecular (kDa ou g mol^{-1})
M_P	– Massa de proteína na amostra
n	– Número médio de ligações peptídicas clivadas por proteína
N	– Nitrogênio (Kjeldahl)
N_b	– Normalidade da solução alcalina usada na hidrólise
n_{tot}	– Número médio de ligações peptídicas por unidade de proteína
p	– Valor-p (probabilidade de significância)

pH	– pH da reação ou do meio em que a análise foi realizada
pK	– pK médio das proteínas presentes na hidrólise
R	– Refletância
r	– Coeficiente de correlação de Pearson
t	– Tempo (min, s ou h)
T	– Temperatura (°C ou K)
V	– Volume (mL)
X_i	– Variáveis codificadas do planejamento experimental
α	– Grau de dissociação médio dos grupos α -NH durante a hidrólise
ε	– Coeficiente de extinção molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivo geral	18
1.1.2 Objetivos específicos	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 PROTEÍNA ANIMAL.....	19
2.1.1 Consumo de carne de frango no Brasil	19
2.1.2 Utilização de farinhas de origem animal na avicultura	21
2.1.3 Impacto ambiental da atividade dos abatedouros	23
2.2 HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS	25
2.2.1 Proteases	26
2.2.2 Grau de hidrólise (GH)	28
2.3 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS	30
2.4 PEPTÍDEOS BIOATIVOS.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 MATERIAIS	35
3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FARINHA DE SANGUE DE FRANGO	35
3.3 OBTENÇÃO DOS HIDROLISADOS E ANÁLISE DO PROCESSO	36
3.3.1 Procedimento de hidrólise da farinha de sangue de frango	36
3.3.2 Determinação do grau de hidrólise (GH)	36
3.3.3 Planejamento experimental de Doehlert e análise do modelo estatístico.....	37
3.3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio em presença de tricina (SDS-Tricina-PAGE)	38
3.3.5 Conteúdo de heme nos hidrolisados	39
3.4 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E DE COR.....	39
3.4.1 Análise de cor.....	39
3.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	40
3.5 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)	40
3.6 ANÁLISE DA ESTRUTURA QUÍMICA DOS HIDROLISADOS	40
3.6.1 Espectros de absorção ultravioleta	40
3.6.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	41
3.6.3 Espectroscopia de dicroísmo circular no ultravioleta distante	41

3.7 PROPRIEDADES FUNCIONAIS.....	42
3.7.1 Capacidade de retenção de óleo.....	42
3.7.2 Propriedades de espuma	42
3.7.3 Propriedades emulsificantes	43
3.7.3.1 Atividade e estabilidade das emulsões O/A.....	43
3.7.3.2 Microscopia ótica	43
3.7.4 Propriedades antioxidantes dos hidrolisados	44
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FARINHA DE SANGUE DE FRANGO	45
4.2 HIDRÓLISE DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO	46
4.3 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E DE COR.....	52
4.4 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA	54
4.5 ALTERAÇÕES NA ESTRUTURA QUÍMICA DOS HIDROLISADOS	57
4.6 PROPRIEDADES FUNCIONAIS.....	60
4.7 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES	67
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
5.1 CONCLUSÃO.....	71
5.2 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	72
REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

O setor agroindustrial brasileiro representa cerca de um quarto da economia nacional e a produção de alimentos ocupa o papel mais importante. No âmbito dos alimentos, a produção vegetal e a de origem animal estão interligadas e são afetadas pela distribuição e localização dos centros consumidores. A produção de carne tem grande relevância entre os alimentos de origem animal; o consumo tem aumentado, impulsionado pelo crescimento populacional e pela redução da pobreza e da miséria. No entanto, o aumento da produção para atender a demanda resulta em uma maior geração de efluentes principalmente líquidos, consequência preocupante, mas que eleva o interesse em tecnologias para seu reaproveitamento.

Em virtude do crescente rigor da legislação ambiental, buscam-se reduzir a geração de resíduos e identificar formas menos onerosas de tratá-los e destiná-los. No que diz respeito à produção de carne, mais precisamente a etapa de abate, o sangue é um subproduto bastante preocupante. Uma vez presente no efluente líquido dos abatedouros, confere elevadíssima carga poluente e torna necessário um complexo processo de tratamento para que seja possível lançar esse efluente tratado em corpos hídricos. Assim, torna-se necessária a valorização desse material. Uma das alternativas que tem sido amplamente empregada é a produção de farinha de sangue que, por seu elevado conteúdo proteico (acima de 80% em proteína bruta, base seca), pode ser usada na alimentação animal. Essa aplicação tem por objetivo reduzir os custos de produção a partir da mistura de rações convencionais com farinha de subprodutos e também mitiga o impacto ambiental dos abatedouros.

A comunidade científica tem, no entanto, observado e estudado outros destinos ainda mais interessantes do ponto de vista econômico que podem ser dados a esse subproduto. O sangue, por ser uma rica fonte de ferro, pode ser usado como ingrediente em suplementos deste mineral, sendo de grande interesse no combate à anemia ferropriva, problema nutricional de elevadíssima magnitude e o segundo maior causador de doenças na infância. Além disso, já é um ingrediente usado no mundo inteiro em algumas receitas típicas; no caso do Brasil, pode ser citado o frango ao molho pardo e a morcela. Nas últimas décadas, também tem crescido o número de estudos que tratam o sangue de animais como fonte de peptídeos bioativos, micronutrientes oriundos da quebra de ligações peptídicas de proteínas. Estes contribuem para reduzir a alergenicidade e podem ser incorporados

em alimentos funcionais, que possuem o objetivo de produzirem, além das funções nutricionais básicas, efeitos benéficos para a saúde, por exemplo, melhorar as atividades metabólicas, prevenir doenças e retardar o envelhecimento. Além de promover benefícios à saúde, peptídeos também contribuem para a textura e outras propriedades organolépticas dos alimentos. Apresentam, ainda, excelentes propriedades funcionais para a indústria de alimentos, como melhorar a formação e a estabilidade de emulsões e espumas, aumentar a solubilidade de proteínas e a viscosidade de uma solução, além de formar géis em condições adequadas.

Enquanto o sangue bovino e suíno tem sido amplamente estudado com as finalidades supracitadas, poucos estudos abordam o potencial do sangue de frango como fonte de compostos de interesse para a indústria de alimentos. Portanto, neste contexto, o presente trabalho fez um levantamento de propriedades físico-químicas, funcionais e antioxidantes de proteína de farinha de sangue de frango hidrolisada enzimaticamente e de como as condições de processo afetam essas propriedades.

O texto foi estruturado em cinco seções. A segunda seção traz uma revisão de literatura sobre o assunto, aprofundando sobre a produção e o consumo de carne, a hidrólise de proteínas e as propriedades funcionais e antioxidantes de peptídeos. A terceira apresenta a metodologia desenvolvida, enquanto o quarto traz os resultados obtidos e as discussões pertinentes. Por fim, a quinta e última seção faz um apanhado das observações deste trabalho em suas considerações finais, apresentando também recomendações para trabalhos futuros dentro do tema.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho foi estudar a hidrólise enzimática de proteína de farinha de sangue de frango e o efeito das condições de processo em propriedades físico-químicas, funcionais e antioxidantes dos hidrolisados obtidos.

1.1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Caracterizar a farinha de sangue de frango quanto à sua composição centesimal em proteína bruta, umidade e cinzas, além de estabelecer sua composição mineral;
- Determinar as condições ótimas para a hidrólise enzimática de proteína de farinha de sangue de frango visando maximizar o grau de hidrólise;
- Estabelecer uma relação entre a extensão da hidrólise com propriedades visuais e morfológicas dos hidrolisados;
- Investigar o impacto da hidrólise enzimática na estabilidade térmica dos hidrolisados;
- Estudar o efeito do tempo de hidrólise sobre características físico-químicas dos hidrolisados;
- Estudar propriedades emulsificantes dos hidrolisados em emulsões O/A e compará-las com as propriedades de uma proteína comercial;
- Estudar propriedades de espuma dos hidrolisados em soluções aquosas preparadas com diferentes pH e compará-las com as propriedades de uma proteína comercial;
- Verificar se a hidrólise enzimática de proteína de farinha de sangue de frango resulta na produção de peptídeos com atividade antioxidante.

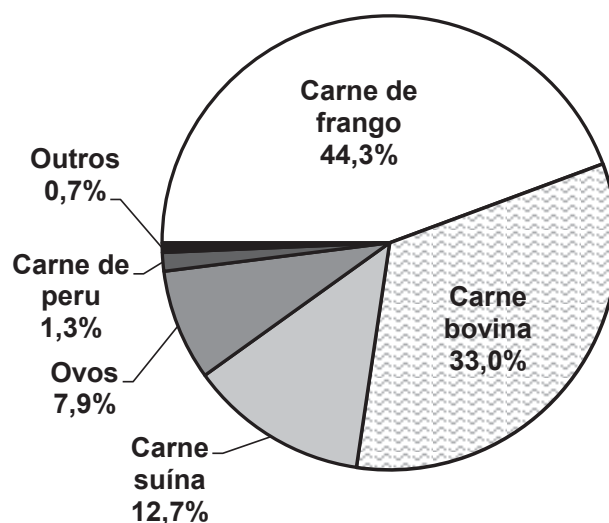
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROTEÍNA ANIMAL

2.1.1 Consumo de carne de frango no Brasil

De acordo com FILHO e colaboradores (2011), o consumo de proteína animal no mundo é um grande indicador de bem-estar das sociedades. Segundo os autores, o seu consumo cresce conforme o nível de renda da população. No Brasil, a produção de proteína animal é dominada pelas carnes de frango e boi, totalizando quase 80% do total. Além dessas, completam o grupo das quatro mais importantes fontes de proteína a carne suína e ovos de galinha, como mostram levantamentos da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) e pela Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC) (FIGURA 1).

FIGURA 1 – PRODUÇÃO DE PROTEÍNA ANIMAL NO BRASIL EM 2017.



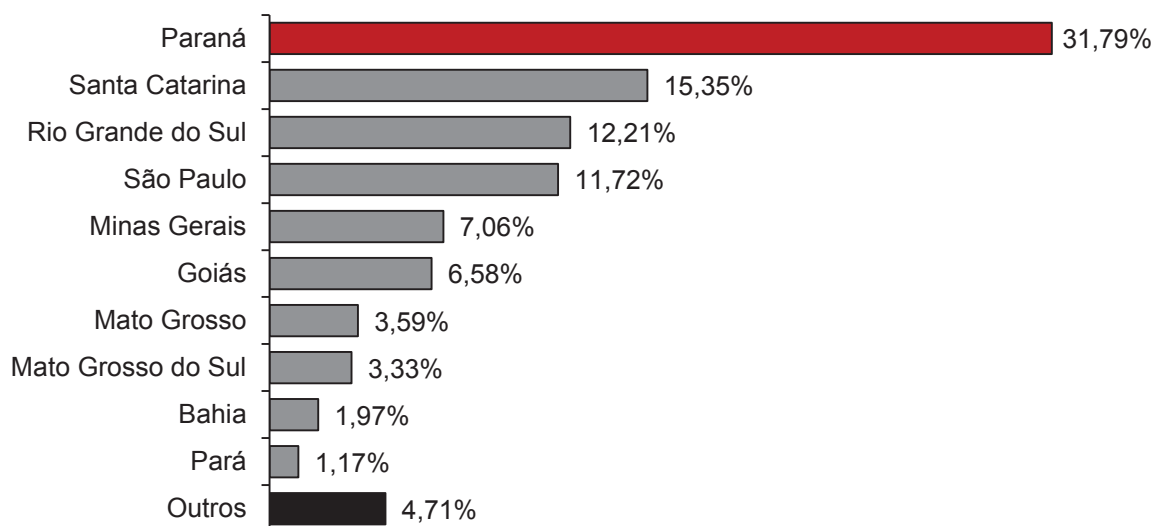
Valores percentuais correspondentes a um total de 29,4 milhões de toneladas.

FONTE: adaptado de ABPA (2018) e ABIEC (2018).

A avicultura é uma atividade praticada desde os primórdios da humanidade e, desde 1975, se consolida no mundo como uma das mais importantes fontes de proteína animal. Nas últimas quatro décadas, a produção brasileira apresentou um crescimento anual médio de 10% (FILHO *et al.*, 2011). Segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2018), em 2017, o Brasil produziu 13,2 milhões de toneladas de frangos de corte e é o segundo maior produtor mundial, atrás dos Estados Unidos e à frente da China. A entidade estima

que a produção brasileira deva aumentar este ano, alcançando a marca de 13,6 milhões de toneladas ainda em outubro. No cenário nacional, o Paraná produziu 4,3 milhões de toneladas de frango de corte em 2017 e é o líder de produção do Brasil, como mostra a FIGURA 2.

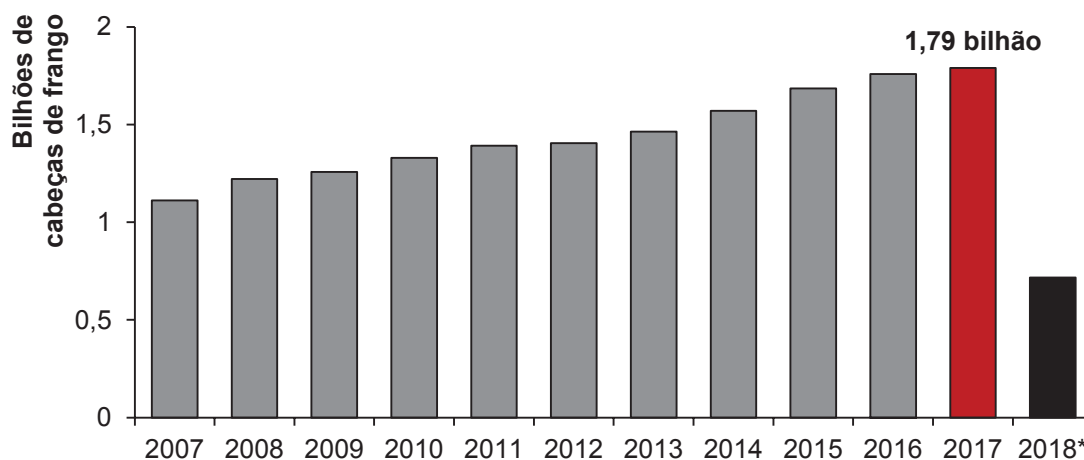
FIGURA 2 – RANKING PRODUÇÃO DE FRANGOS DE CORTE NO BRASIL.



FONTE: EMBRAPA (2018).

Segundo dados do SINDIAVIPAR (2018), de 2007 a 2016, os abates de frango no Paraná registraram um crescimento médio anual de 4,9%, chegando à marca de 1,79 bilhão de abates no estado em 2017 e acumulou um crescimento de 61,1% em relação a 2007, como mostra a FIGURA 3.

FIGURA 3 – ABATES DE FRANGO NO PARANÁ NA ÚLTIMA DÉCADA.



* Maio/18

FONTE: SINDIAVIPAR (2018).

Entre os fatores que contribuíram para esses resultados positivos, destacam-se avanços tecnológicos no setor, aumento da renda per capita da população e da sua distribuição nas últimas duas décadas (USDA, 2018). Além disso, a evolução dos hábitos alimentares, em que a praticidade no preparo das refeições é um fator importante, também favorece o crescimento do consumo nacional de frango (FILHO *et al.*, 2011). Ao traçar as tendências de consumo dos próximos anos no Brasil, VENTURA (2009) elenca, entre outros fatores, a maior exigência por qualidade, o envelhecimento da população e a valorização da saúde nas decisões de consumo.

2.1.2 Utilização de farinhas de origem animal na avicultura

A avicultura é o principal agente de movimentação do mercado de rações. Somente na produção primária, representa a maior demanda de milho e de farelo de soja no Brasil. A EMBRAPA calcula que essas atividades foram responsáveis por 34% da demanda de todo o consumo de milho do país, assim como por parte expressiva do farelo de soja (FILHO *et al.*, 2011). No entanto, esses constituintes representam alto custo para o produtor, que busca alimentos alternativos para uso na avicultura. Convenientemente, subprodutos de abatedouros podem ser utilizados como fonte alternativa de proteína e fósforo para rações, reduzindo o custo da dieta dos animais ao substituírem parcial ou totalmente ingredientes convencionais. Além disso, eleva-se o lucro dos abatedouros e minimiza a poluição ambiental que poderia ser causada caso esses resíduos fossem descartados de forma inapropriada (JAIN; DHAKAL; ANAL, 2017). O sangue, principal subproduto da indústria de processamento de carnes (CHANDRASEKARAN, 2013), é rico em proteína (17 a 18% em massa) e possui composição de aminoácidos balanceada, apresentando diversas possibilidades de uso, incluindo alimentos e farinhas usadas como ração animal (OCKERMAN; HANSEN, 1988). No entanto, as farinhas de origem animal possuem restrições quanto ao uso devido à sua qualidade sanitária questionável e composição nutricional muito variável. Essas dificuldades estão associadas ao controle e ao processamento das matérias-primas. Entre as mais utilizadas, encontram-se a farinha de penas hidrolisadas, a farinha de vísceras, a farinha de carne e ossos e a farinha de sangue (MATIAS *et al.*, 2012).

A farinha de sangue é obtida pela dessecação do sangue fresco coletado em abatedouros. Tradicionalmente, a coagulação da albumina sérica ocorre através de aquecimento lento. Separada a parte líquida por decantação, o resíduo sólido é secado e depois moído. Alternativas de processo incluem a secagem a vácuo para reduzir o tempo de processamento e o sistema *spray-dryer* em vez da coagulação lenta para elevar a digestibilidade da farinha de sangue ao reduzir as alterações físico-químicas em suas proteínas (ANDRIGUETTO *et al.*, 2002).

As farinhas de sangue como a de frango costumam ser excelentes fontes de aminoácidos essenciais (QUADRO 1), porém limitadas em isoleucina (Ile) e metionina (Met). Comparado ao sangue de outros animais, o sangue de aves apresenta maiores níveis de Ile (27,6 a 30,6 mg/g proteína), enquanto os níveis de Met costumam ser inferiores ao recomendado pela OMS (16 mg/g proteína), com faixas que variam entre 6,3 e 7,2 mg/g para sangue de aves e 2,8 a 9,6 mg/g para sangue bovino e suíno (SORAPUKDEE; NARUNATSOPANON, 2017).

QUADRO 1 – PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO.

Parâmetros	Farinha de sangue de frango	Recomendado pela OMS (2007)
<i>Aminoácidos essenciais</i>		
Leucina (Leu)	94,8	59
Lisina (Lys)	76,0	45
Valina (Val)	52,9	39
Histidina (His)	48,1	15
Fenilalanina (Phe)	56,0	38 (Phe + Tyr)
Tirosina (Tyr)	31,3	
Treonina (Thr)	49,1	23
Isoleucina (Ile)	30,6	30
Metionina (Met)	6,3	16
<i>Aminoácidos não-essenciais</i>		
Ácido aspártico (Asp)	79,0	
Ácido glutâmico (Glu)	97,4	
Alanina (Ala)	67,5	
Arginina (Arg)	52,8	
Serina (Ser)	41,2	
Glicina (Gly)	35,6	
Prolina (Pro)	35,7	

* Valores apresentados em mg/g proteína.

FONTE: adaptado de WHO/FAO/UNU (2007); SORAPUKDEE; NARUNATSOPANON (2017).

2.1.3 Impacto ambiental da atividade dos abatedouros

A carne de frango é o segundo tipo de carne mais consumida no mundo, atrás apenas da carne suína. Como visto no começo deste capítulo, é a proteína mais consumida no Brasil, aproximadamente 42 kg por habitante ao ano (ABPA, 2018). Devido ao crescente consumo desse alimento, há um aumento no número de abatedouros e a busca do setor por melhorias nos seus processos produtivos (PINTO *et al.*, 2015).

Os impactos ambientais dessa atividade são preocupantes, pois utiliza grandes volumes de água, além de gerar resíduos e efluentes com elevada carga orgânica. Mundialmente, a indústria de processamento de carne utiliza 24% do total de água consumida pela indústria de alimentos e bebidas e 29% de todo o consumo do setor agrícola. Consequentemente, os abatedouros são grandes consumidores de água (2,5 a 40 m³ de água por tonelada de carne produzida) e também grandes produtores de efluentes líquidos (BUSTILLO-LECOMPTE; MEHRVAR, 2015).

O efluente líquido de abatedouros traz grande preocupação ambiental devido à sua complexa composição em gordura, proteínas e fibras decorrentes do processo de abate. A maior parte da contaminação é causada pelo sangue e pelo muco gástrico e intestinal. Além disso, esse efluente contém elevados teores de matéria orgânica, sais e microrganismos, além de detergentes e desinfetantes usados na limpeza das instalações e equipamentos. Nutrientes, metais pesados, cor e turbidez entre outros também são encontrados (BUSTILLO-LECOMPTE; MEHRVAR, 2015). O QUADRO 2 traz os principais parâmetros do efluente de abate e processamento de aves. Nota-se que as faixas são bastante amplas e frequentemente seus parâmetros estão muito acima dos limites permitidos pela legislação ambiental. Além desses parâmetros, a Resolução CONAMA 430/2011 também estabelece padrões específicos para o lançamento direto de efluentes: pH entre 5 e 9, temperatura inferior a 40 °C (excedendo até 3 °C no limite da zona de mistura), 1 mL/L de materiais sedimentáveis e ausência de materiais flutuantes.

QUADRO 2 – PARÂMETROS DO EFLUENTE DE ABATE E PROCESSAMENTO DE AVES.

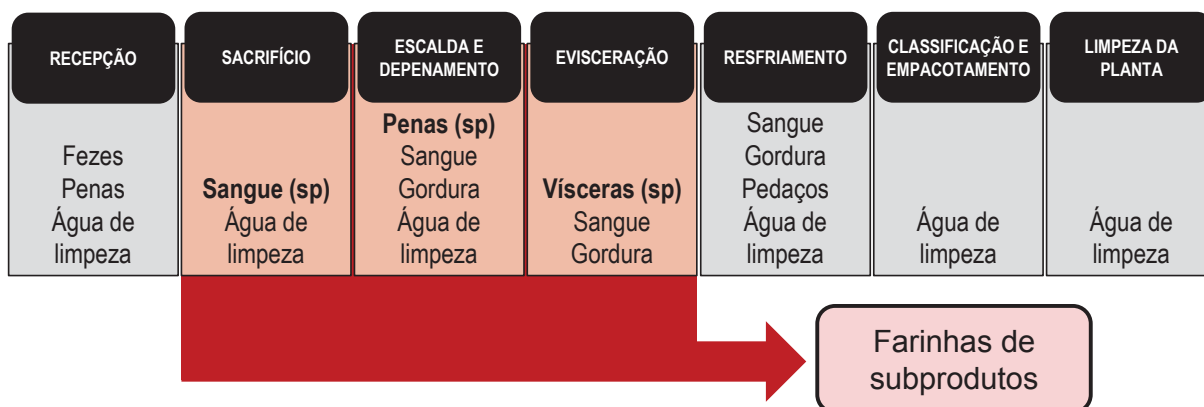
Parâmetros	Faixas encontradas	Limites permitidos
DBO (mg O ₂ /L)	710 – 4.633	60 ^a
DQO (mg O ₂ /L)	1.400 – 11.118	200 ^a
Óleos e graxas (mg/L)	50 – 897	50 ^a
N total (mg/L)	110 – 700	n/d
N amoniacal (mg/L)	3 – 300	20 ^b
P total (mg/L)	13 – 120	n/d
Alcalinidade (mg/L)	350 – 800	n/d

DBO – demanda bioquímica de oxigênio; DQO – demanda química de oxigênio; N – nitrogênio; P – fósforo; n/d – não definido. (a) Limites estabelecidos pela Resolução CEMA 70/2007 - Anexo 7; (b) limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 430/2011.

FONTE: adaptado de PINTO e colaboradores (2015).

O processo de abate de frangos envolve o descarte de diversas partes da ave por não serem adequadas para o consumo humano e não terem fins comerciais, como as carcaças desclassificadas. O rendimento (relação corte/inteiro) oscila entre 72 e 82% sem considerar a absorção de água e os subprodutos mais aproveitados são penas, sangue e vísceras (PINTO *et al.*, 2015), como é possível observar na FIGURA 4.

FIGURA 4 – RESÍDUOS E SUBPRODUTOS RESULTANTES DAS ETAPAS DO PROCESSAMENTO AVÍCOLA.



FONTE: CHANDRASEKARAN (2012); PINTO e colaboradores (2015)

Sérios problemas ambientais decorrem da não utilização de subprodutos de abatedouros, além do custo adicional envolvido no seu correto destino (JAYATHILAKAN *et al.*, 2012). Por isso, cresce o interesse em novas formas de revalorizar esses subprodutos, normalmente divididas em geração de energia e fabricação de produtos (VALTA *et al.*, 2015). Podem ser citados, por exemplo, seu

uso em biorrefinarias, sua incorporação na própria cadeia produtiva como fonte alternativa de alimento para animais, recuperação de proteínas e obtenção de nutracêuticos, adsorção de metais pesados em águas contaminadas e, ainda, sua utilização na produção de nanopartículas e plásticos biodegradáveis (ARVANITOYANNIS; LADAS, 2008; MIRABELLA; CASTELLANI; SALA, 2014; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016; VALTA et al., 2015). Entretanto, ao contrário dos resíduos gerados na manufatura de produtos vegetais, sua recuperação está sujeita a severas limitações higiênicas e sanitárias, como o risco de contaminação e de transmissão de doenças devido à elevada contagem microbiológica patogênica (MIRABELLA; CASTELLANI; SALA, 2014).

2.2 HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS

Subprodutos ricos em proteínas oriundos da agricultura e da indústria têm sido objeto de estudo de muitos pesquisadores com o objetivo de obter concentrados e isolados proteicos ou melhorar as propriedades funcionais dessas fontes (CIAN; DRAGO; GONZÁLEZ, 2012). A hidrólise é uma das alternativas que permitem a modificação das proteínas desses produtos, podendo ser realizada por meio de métodos químicos (hidrólise ácida ou alcalina), físicos (pressão e temperatura) ou enzimáticos, sendo que estes apresentam vantagens consideráveis em relação aos químicos (BAH et al., 2016a; CIAN; DRAGO; GONZÁLEZ, 2012). Geralmente, as condições empregadas são brandas; pH na faixa de 6 a 8 e temperatura de 40 a 60 °C, de modo a garantir a atividade proteolítica (BAH et al., 2016a). Enquanto isso, outros métodos requerem o uso de condições mais severas, por exemplo, hidrólise em água subcrítica (ÁLVAREZ et al., 2016; ÁLVAREZ; RENDUELES; DÍAZ, 2012) e hidrólise enzimática em alta pressão hidrostática (TOLDRA et al., 2011).

Ao se considerar as características esperadas do hidrolisado enzimático, é importante a selecionar a enzima e as condições de processo com atenção. A combinação entre razão enzima/substrato (E/S), temperatura e pH são traduzidos no grau de hidrólise (GH) e possuem grande impacto nas qualidades dos peptídeos produzidos (BAH et al., 2016a). Estudar o efeito e como controlar essas condições é recorrente na busca por peptídeos bioativos a partir de sangue de animais de abate. Exemplos de como as características dos peptídeos são afetadas incluem: razão

heme/proteína (IN; JEONG CHAE; OH, 2002), atividade antioxidante (CHENG *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2011), atividade antimicrobiana (ADJE *et al.*, 2013), inibição da enzima conversora de angiotensina I (GÓMEZ; ZAPATA, 2014; HUANG; LIU, 2010), cor e conteúdo de ferro (CIAN; DRAGO; GONZÁLEZ, 2012) e liberação de heme para microencapsulação (WANG *et al.*, 2017).

2.2.1 Proteases

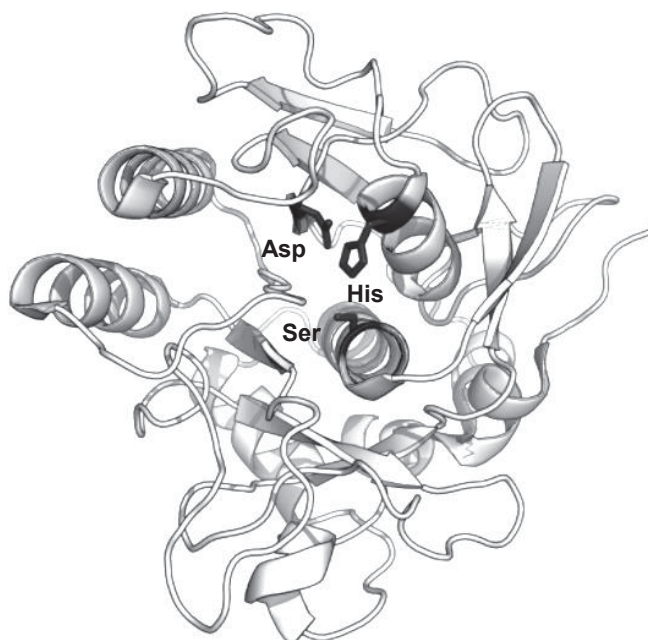
Proteases ou peptidases são enzimas que promovem a cisão catalítica de ligações peptídicas (entre uma carboxila e uma amina) em proteínas. Elas formam a maior classe de enzimas e constituem 2% do genoma humano (LI *et al.*, 2013). As enzimas são classificadas e denominadas segundo o Comitê de Enzimas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), estando divididas em seis classes, entre elas as hidrolases (enzimas que catalisam a hidrólise de ligações covalentes). Nessa classe, estão inseridas as proteases (EC 3.4), que são agrupadas em famílias que se distribuem em superfamílias (clãs) denominadas de acordo com o aminoácido representativo ou o cofator presente no sítio ativo envolvido na reação (TAVANO, 2013).

Quanto à posição da ligação peptídica clivada em uma proteína ou peptídeo, proteases são classificadas em dois grupos. As endopeptidases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas internas. As exopeptidases, por sua vez, provocam o rompimento das ligações nos terminais e, por isso, são subdivididas em aminopeptidases (terminal N) ou em carboxipeptidases (terminal C) (HOOPER, 2002). Assim, o uso de endopeptidases na proteólise resulta em um número elevado de peptídeos, enquanto o uso de exopeptidases produz maior quantidade de aminoácidos. Essa característica foi explorada por IN, JEONG CHAE e OH (2002), que realizaram a hidrólise de hemoglobina bovina em duas etapas; a primeira com Epserase®, uma endopeptidase, e a segunda com Flavourzyme®, um complexo enzimático que contém endo e exopeptidases, buscando um elevado grau de hidrólise. Seguindo esse método, CHANG, WU, CHIANG (2007) compararam o processo em uma e em duas etapas empregando Alcalase®, uma endopeptidase alcalina, e Flavourzyme®, verificando que a hidrólise em duas etapas resulta em peptídeos com maior capacidade de ligação com o ferro, enquanto o processo com Alcalase® resulta em peptídeos com maior atividade antioxidante.

Devido às particularidades de cada enzima, é importante uma seleção cautelosa da mais adequada para a aplicação desejada. Na indústria, proteases alcalinas são extensivamente empregadas por suas vantagens: elevada atividade catalítica, elevado grau de especificidade e podem ser produzidas em larga escala com viabilidade econômica. Além disso, suas aplicações comerciais incluem limpeza de membranas, síntese catalítica de peptídeos e resolução de misturas racêmicas de aminoácidos (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

Além de seu uso na proteólise de hemoglobina suína que resultou em peptídeos com maior atividade antioxidante (CHANG; WU; CHIANG, 2007), a Alcalase® também exibiu resultados melhores que outras enzimas quanto à produção de peptídeos com atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina I (ligada à hipertensão) a partir da hidrólise de farinha de sangue de frango (HUANG; LIU, 2010). Mais recentemente, foi observado que, das proteínas do sangue de galo-banquiva (*Gallus gallus*), ao promover sua hidrólise com Alcalase®, as proteínas do plasma resultam em peptídeos com maior atividade antioxidante (CHENG et al., 2016).

FIGURA 5 – ESTRUTURA DA PEPTIDASE S08.001: SUBTILISINA CARLSBERG COM A TRÍADE CATALÍTICA DESTACADA EM MODELO DE BOLAS E VARETAS.



FONTE: MEROPS (2018).

Alcalase® é a primeira enzima da família das subtilisinas (S8), denominada subtilisina Carlsberg e que compreende as serina endopeptidases extracelulares. Foi isolada pela primeira vez da bactéria *Bacillus subtilis*, o que deu origem ao nome a

essa família. As subtilisinas utilizam uma tríade catalítica composta por ácido aspártico (Asp), histidina (His) e serina (Ser) (FIGURA 5). São estáveis na faixa de pH 7–10 e são proteases relativamente não específicas. Quanto à sua estrutura, apresentam 268–275 resíduos de aminoácidos e 26,9–27,5 kDa. O ponto isoelétrico (pI) varia de 7,8 para a subtilisina BPN' a aproximadamente 11 para as subtilisinas isoladas da espécie *B. lentus*. Além disso, apresenta dois sítios de ligação com o cálcio; um com baixa e outro com elevada afinidade, importantes na estabilização da sua estrutura (GRAYCAR *et al.*, 2013).

2.2.2 Grau de hidrólise (GH)

O grau de hidrólise (GH) é definido como a fração das ligações peptídicas clivadas durante a reação enzimática e suas formas de determinação são diversas, não havendo método padrão para determinação do GH (RUTHERFURD, 2010).

Entre os mais utilizados, o pH-Stat é uma técnica prática para o monitoramento do GH em tempo real pela adição de base ou ácido a fim de se manter o pH da reação a um valor constante e foi desenvolvida por JACOBSEN e colaboradores (1957). Quando a hidrólise é conduzida em um pH superior ao pK_a dos grupos α -NH, o número de ligações peptídicas quebradas é proporcional ao consumo de base (ADLER-NISSEN, 1977), como mostra a Eq. (1):

$$GH_{pH-Stat} (\%) = \frac{h}{h_{tot}} = 100 \times \frac{B \times N_b}{\alpha \times M_p \times h_{tot}} \quad (1)$$

onde ***h*** é o número médio de ligações peptídicas clivadas, ***h_{tot}*** é o número médio de ligações peptídicas no substrato, ***B*** é o consumo de base (mL), ***N_b*** é a normalidade da solução alcalina, ***α*** é o grau de dissociação médio dos grupos α -NH calculado pela Eq. (2) e ***M_p*** é a massa de proteína no substrato (g).

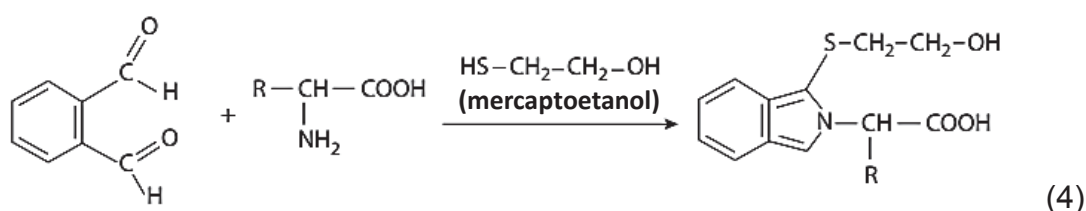
$$\alpha = \frac{10^{(pH-pK)}}{1+10^{(pH-pK)}} \quad (2)$$

onde ***pH*** é o pH da reação e ***pK*** é o pK médio das proteínas presentes. Como a natureza do substrato costuma ser bastante complexa, a equação de Steinhardt & Beychok (1964) é usada para estimar o valor do pK na temperatura de reação ***T*** (K), como mostra a Eq. (3):

$$K = 7.8 + \frac{2400 \times (298 - T)}{298 \times T} \quad (3)$$

Apesar do pH-Stat ser prático e permitir monitorar o GH em tempo real de forma simples, por ser uma forma indireta de determinar a extensão da hidrólise, sua confiabilidade é bastante limitada. Assim, faz-se necessário determinar o GH por técnicas mais confiáveis, como a do orto-ftaldialdeído (OPA) e a do ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS), que envolvem uma etapa de derivatização (RUTHERFURD, 2010).

Desenvolvido por CHURCH e colaboradores (1983), o método do OPA apresenta a vantagem de ser mais rápido, também podendo ser usado como uma forma de monitoramento do GH em tempo real. A técnica tem como princípio a reação de aminoácidos com OPA (1,2-benzeno dicarbonal) na presença de um tiol (2-mercaptoetanol, por exemplo), produzindo um derivativo altamente fluorescente com máximo de excitação a 380 nm e máxima emissão fluorescente a 450 nm, como mostra a (DAMODARAN, 2017):



A determinação do GH por essa técnica consiste em reagir uma amostra de hidrolisado com OPA na presença de um tiol e medir sua absorbância a 340 nm. Esse valor é então usado para calcular o número médio de ligações peptídicas clivadas por proteína (n) usando a Eq. (5):

$$n = \frac{A_{340} \times M \times V}{\epsilon \times d \times M_p} \quad (5)$$

onde A_{340} é a absorbância lida a 340 nm, M é a massa molar média da proteína no substrato (g mol^{-1}), V é o volume de reação (mL), ϵ é o coeficiente de extinção molar da proteína ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), d é o fator de diluição e M_p é a massa de proteína no substrato (g). De posse do valor de n , o GH_{OPA} pode ser calculado com o número médio de ligações peptídicas por unidade de proteína (n_{tot}) usando a Eq. (6):

$$\text{GH}_{\text{OPA}} (\%) = 100 \times \frac{n}{n_{\text{tot}}} \quad (6)$$

2.3 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS

As proteínas são componentes funcionais básicos de vários produtos alimentícios e possuem grande influência em propriedades sensoriais e nutricionais. As propriedades funcionais são aquelas que dizem respeito de como as proteínas se comportam em sistemas alimentícios durante a sua preparação, processamento, armazenamento e consumo. Destacam-se: solubilidade, retenção de água, propriedades de espuma, gelificação, propriedades emulsificantes e retenção de óleos e gorduras (ZAYAS, 1997).

Um dos fatores mais importantes para as interessantes propriedades funcionais das proteínas é sua natureza anfifílica, pois possuem tanto grupos hidrofílicos como hidrofóbicos em sua estrutura (FOEGEDING; DAVIS, 2011). As propriedades funcionais das proteínas são prejudicadas quando estão presentes em meio com pH próximo ao seu ponto isoelétrico, que é o caso da maioria dos alimentos ácidos. Por isso, a modificação enzimática de proteínas de alimentos tem sido usada para melhorar essas propriedades em amplos intervalos de pH e outras condições de processo, permitindo maior aplicabilidade desses ingredientes (PANYAM, 1996).

A hidrólise parcial tem sido usada para melhorar diversas propriedades funcionais de proteínas, aumentando a solubilidade, revelando grupos hidrofóbicos, aumentando sua hidrofobicidade e reduzindo sua massa molecular (LAM; NICKERSON, 2013). O QUADRO 3 elenca uma série de propriedades funcionais de proteínas que são modificadas em decorrência da hidrólise. No entanto, o uso da hidrólise para aumento da funcionalidade de proteínas está limitado a baixos graus de hidrólise; por exemplo, proteínas extensivamente hidrolisadas costumam perder parte significativa de suas propriedades emulsificantes, pois tendem a saturar a fase contínua em vez de aderir à interface água-óleo (CONDE; RODRÍGUEZ PATINO, 2007).

QUADRO 3 – PEPTÍDEOS E HIDROLISADOS DE PROTEÍNA: PROPRIEDADES FUNCIONAIS E CARACTERÍSTICAS RESULTANTES DE SUA APLICAÇÃO.

Propriedade	Características de peptídeos e hidrolisados de proteína
Solubilidade	Apresentam alta solubilidade, especialmente na faixa de pH 4–5, devido à maior ionização de grupos amino e carboxil.
Estabilidade térmica	Adquirem estabilidade térmica mesmo em baixos graus de hidrólise, podendo ser melhorada pela formação de complexos com polissacarídeos (ex.: ácido galacturônico).
Propriedades emulsificantes	Habilidade emulsificante melhorada até certo grau de hidrólise, estando restrita a tratamentos enzimáticos limitados. Hidrolisados com alto grau de hidrólise, obtidos com o objetivo de reduzir a alergenicidade, podem ter suas propriedades emulsificantes melhoradas pela mistura com polissacarídeos como derivados de amido.
Propriedades reológicas	Hidrolisados de proteína apresentam viscosidade altamente reduzida e praticamente nenhuma capacidade de gelificação. Apesar de normalmente não formarem géis, podem auxiliar em etapas de processamento de alimentos ricos em nitrogênio.
Osmolaridade	A osmolaridade de hidrolisados de proteína aumenta consideravelmente com a extensão da hidrólise. Alimentos com alta osmolaridade estão relacionados com a retenção de líquido no intestino delgado, provocando distúrbios intestinais e outros sintomas adversos. O controle da osmolaridade de alimentos contendo peptídeos é feito pela adição de outros ingredientes como o amido.
Propriedades organolépticas	Hidrolisados de proteína costumam apresentar sabor amargo, principalmente relacionado à presença de peptídeos pequenos com aminoácidos hidrofóbicos em seus terminais (Ile, Tyr, Phe, Trp). A redução do sabor amargo em hidrolisados é estudada desde a década de 50 e envolve a separação dos peptídeos amargos, uso de aditivos para mascarar esse sabor e o uso de exopeptidases especiais.

FONTE: NEKLYUDOV; IVANKIN; BERDUTINA (2000)

Neste trabalho, são estudadas três propriedades funcionais dos hidrolisados de farinha de sangue de frango: capacidade de retenção de óleo, propriedades de espuma e propriedades emulsificantes. A habilidade de proteínas em reter óleos e gorduras é uma importante propriedade funcional para a indústria de alimentos, especialmente para produtos de confeitaria e à base de carne, pois intensifica a retenção de sabor e melhora a percepção de textura (KINSELLA; MELACHOURIS, 1976). Espumas são definidas como sistemas coloidais bifásicos termodinamicamente instáveis, onde a fase gás é dispersa em uma fase líquida contínua (MYERS, 2006). A espumabilidade ou capacidade de espuma está relacionada à habilidade das proteínas em reduzir a tensão superficial, enquanto a

estabilidade da espuma depende da extensão das interações proteína-proteína ocorrendo na rede intermolecular (PHILLIPS; WHITEHEAD; KINSELLA, 1994). Já o estudo das propriedades emulsificantes de proteínas e de seus hidrolisados é muito relevante porque a emulsificação é um processo importante na produção de muitos alimentos formulados onde as proteínas agem como importantes estabilizantes, combinadas com lipídeos e carboidratos (ZAYAS, 1997). É sabido que o emulsificante ideal deve adsorver rapidamente na superfície das gotas da emulsão e reduzir significativamente a tensão interfacial enquanto forma uma capa protetora ao redor das gotas, evitando sua agregação devido a forças de repulsão (MCCLEMENTS, 2015). Proteínas são amplamente usadas como emulsificantes em alimentos principalmente devido às suas propriedades anfifílicas, que lhes permitem migrar rapidamente para a interface óleo/água. Entretanto, a camada interfacial formada em torno das gotas costuma ter espessura de 1 a 10 nm, então as forças de atração de van der Waals são significativamente mais intensas que as forças devido à repulsão estérica pela camada proteica e as gotas tendem a se agregar quando na ausência de outras interações repulsivas fortes, especialmente quando a força iônica da fase aquosa envolvendo as gotas é aumentada, consequentemente reduzindo a repulsão eletrostática (MCCLEMENTS; BAI; CHUNG, 2017).

As aplicações de peptídeos como ingredientes em alimentos são amplas graças à sua diversidade. Assim, pode-se dizer que cada peptídeo possui uma aplicação adequada de acordo com as propriedades funcionais requeridas (LACOU; LÉONIL; GAGNAIRE, 2016), como mostra o QUADRO 4.

QUADRO 4 – EXEMPLOS DE APLICAÇÕES DE PEPTÍDEOS E HIDROLISADOS DE PROTEÍNA DE ACORDO COM CARACTERÍSTICAS ESPERADAS.

Aplicação	Características esperadas
Molhos, sucos e outras bebidas	Alta solubilidade e difusividade
Substituição de clara de ovo	Propriedades de espuma
Produtos cárneos	Baixa viscosidade e alta gelificação
Presuntos macios com perda reduzida durante o cozimento	Capacidade de retenção de água e baixa hidrofobicidade
logurtes e queijos	Propriedades de textura (viscosidade, granularidade, maciez, elasticidade)

FONTE: LACOU; LÉONIL; GAGNAIRE (2016).

2.4 PEPTÍDEOS BIOATIVOS

O interesse em peptídeos bioativos vem de longa data; MELLANDER (1950) foi o responsável pelo primeiro estudo dentro do tema, relacionando a ingestão de peptídeos da caseína do leite com a calcificação de ossos em recém-nascidos raquíticos. Desde então, a comunidade científica tem investigado novas fontes desses fragmentos específicos das proteínas que, além de suas funções nutricionais, provocam impacto positivo nas funções corporais ou em sua condição, podendo trazer benefícios à saúde (BHAT; KUMAR; BHAT, 2015). Esses peptídeos costumam apresentar 2 a 20 aminoácidos e massas moleculares inferiores a 6000 Da, com bioatividade que varia de acordo com sua composição e sequência de aminoácidos (DE CASTRO; SATO, 2015). Frequentemente, esses compostos possuem efeitos como redução de colesterol, além de atividades antiprotzoárias, antivirais, antitrombótica, antioxidante, antihipertensiva e antimicrobial, tornando esses peptídeos atraentes para sua aplicação em alimentos e fármacos (SHAHIDI; ZHONG, 2008).

Os peptídeos bioativos, quando constituintes da cadeia polipeptídica de proteínas, apresentam-se em sua forma inativa ou encriptada. É quando são liberados em um processo de proteólise (hidrólise da proteína) ou fermentação (HAYES *et al.*, 2007) que passam a exibir sua função. Além disso, também ocorrem naturalmente em alimentos ou podem ser sintetizados pelo organismo mediante mecanismos ribossomais ou não, sendo assim capazes de exercer sua ação fisiológica diretamente (LEMES *et al.*, 2016). Para ser considerado bioativo, o componente deve apresentar efeito biológico benéfico e mensurável a um nível fisiológico realístico, estando excluídos dessa definição efeitos como toxicidade, alergenicidade e mutagenicidade (MÖLLER *et al.*, 2008).

No presente trabalho, é dada maior atenção à medida do potencial antioxidante dos peptídeos. Para ser denominado antioxidante, o composto deve ser capaz de retardar ou inibir processos oxidativos que ocorrem sob a influência do oxigênio ou de outras formas reativas. Os antioxidantes estão envolvidos na defesa do organismo contra patologias associadas ao ataque de radicais livres, apresentando-se como antioxidantes endógenos (compostos enzimáticos ou não enzimáticos) e exógenos (vitaminas C, D, E e K, β -caroteno, flavonoides e selênio) (PISOSCHI; NEGULESCU, 2012). São muitos os métodos usados para determinar

atividade antioxidante *in vitro*, porém eles não são capazes de mensurar a atividade antioxidante total de um composto. Além disso, dificilmente os resultados não se traduzem nos benefícios esperados para a saúde de um indivíduo. Ainda assim, métodos colorimétricos de determinação de atividade antioxidante como o DPPH, ABTS e FRAP são importantes para estudar mecanismos e melhorar processos de produtos alimentícios buscando reduzir a perda desses compostos (ZIELINSKI; HAMINIUK; BETA, 2016). Com relação à identificação dos peptídeos antioxidantes, a espectrometria de massas com ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo de voo (MALDI-TOF-MS) tem sido o método de referência. Até cinco anos atrás, mais de 1200 peptídeos com essa e outras bioatividades já haviam sido identificados e catalogados (SINGH; VIJ; HATI, 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Farinha de sangue de frango (FSF) (43,7% de umidade) foi gentilmente doada por uma empresa do interior paranaense. A umidade residual da matéria-prima foi removida em liofilizador Liotop L101 (Liotop, Brasil) a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $<30\text{ Pa}$ por 4 dias e separada em embalagens de polietileno de baixa densidade selados a vácuo em seladora VC999 K3 (VC999, Suíça), que foram armazenados sob refrigeração. Proteína isolada de soja (PIS) comercial foi comprada de um produtor local (Bremil Indústria de Produtos Alimentícios Ltda., Arroio do Meio – RS), apresentando conteúdo de proteína $>90\%$. Solução enzimática Alcalase® 2.4L FG (atividade enzimática declarada: $\geq 2,4\text{ U/g}$), solução de reagente orto-ftaldialdeído (OPA), padrões e reagentes usados nos ensaios de atividade antioxidante (TPTZ, ABTS e DPPH) foram adquiridos junto à Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). L-leucina foi fornecida pela Ajinomoto (Curitiba, Brasil). Outros reagentes utilizados neste trabalho apresentam grau analítico.

3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FARINHA DE SANGUE DE FRANGO

Os métodos oficiais da AOAC (1990) foram usados para determinar a composição química da FSF em termos de umidade residual, cinzas totais, proteína bruta e minerais. A umidade foi calculada com base na perda de massa em estufa com pressão reduzida até massa constante (AOAC 934.01). Proteína bruta foi estimada pelo método de Kjeldahl usando $\text{N} \times 6,25$ (AOAC 954.01). O conteúdo de cinzas foi determinado por perda de massa após incineração em mufla (AOAC 942.05). A análise de minerais incluiu a quantificação de ferro, magnésio, zinco, cobre, manganês, cromo e selênio mediante espectrometria de emissão atômica por plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP OES) (AOAC 968.08). Antes de submetê-las a essa análise, as amostras foram previamente mineralizadas por via seca (dissolvidas em solução de HNO_3 10%) conforme protocolo do Instituto Adolfo Lutz (2005).

3.3 OBTENÇÃO DOS HIDROLISADOS E ANÁLISE DO PROCESSO

3.3.1 Procedimento de hidrólise da farinha de sangue de frango

Farinha de sangue de frango liofilizada foi dispersa em proporção 1:50 (m/v) em água destilada. O pH inicial foi ajustado usando solução 4,0 M de NaOH ou 1,0 M de HCl após o aquecimento da mistura até a temperatura de reação. Após a estabilização das condições iniciais, a hidrólise foi iniciada pela adição de uma quantidade previamente pesada de Alcalase® diluída em 5 mL de água destilada, de acordo com a proporção de enzima em relação ao substrato daquele ensaio. A fim de se avaliar o grau de hidrólise (GH) durante os ensaios pelo método pH-Stat, uma solução 1,0 M de NaOH foi usada, mantendo-se o pH da reação constante enquanto o volume de base adicionada era monitorado. A reação foi interrompida pela inativação da enzima: neutralização usando solução 4,0 M de HCl e aquecimento até a temperatura de ebulição da mistura, que permaneceu em ebulição por 15 min e foi então colocada em um banho de gelo para ser rapidamente resfriada até a temperatura ambiente. Uma alíquota de 15 mL da suspensão foi reservada para a avaliação do GH final pelo método do OPA e a determinação de heme liberada durante a hidrólise. Já para os hidrolisados que foram selecionados para as análises posteriores, o volume remanescente foi centrifugado em uma centrífuga de bancada Excelsa II (Fanem, Brasil) a $3493 \times g$ por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um balão de fundo redondo e concentrado em evaporador rotativo Fisatom 803 (Fisatom, Brasil) a 60 °C por 20 a 30 min (tempo levado até o aumento perceptível da viscosidade da mistura). Os hidrolisados concentrados foram então desidratados em liofilizador VirTis BenchTop Pro (SP Scientific, EUA) por 4 dias a -80 °C e <5 Pa e armazenados sob refrigeração até as análises subsequentes. Este procedimento resultou em 60 a 70% de rendimento em massa de hidrolisado de farinha de sangue de frango (HFSF) por massa inicial de FSF usada na hidrólise.

3.3.2 Determinação do grau de hidrólise (GH)

Para todos os ensaios de hidrólise de FSF, curvas de $GH_{pH-Stat}$ foram construídas utilizando a Eq. (1), levando em conta o volume de base consumido em cada instante de tempo e usando $h_{tot} = 7,6$ meqv/g, valor recomendado para

proteína de origem animal (ADLER-NISSEN, 1986). Parte da alíquota reservada do hidrolisado após a inativação da enzima foi usada para avaliar o GH pelo método do ortoftaldialdeído (OPA) conforme CHURCH e colaboradores (1983), com modificações. Uma alíquota de 22 μL da amostra de hidrolisado previamente diluída a 10% foi adicionada a 2,2 mL da solução de reagente OPA (1 mg/mL OPA e 2-mercaptoetanol como o grupo tiol) em uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm. A cubeta foi agitada com breves toques e deixada em repouso por 3 a 5 min antes da leitura da absorbância a 340 nm em um espectrofotômetro Shimadzu 1800 UV-Vis (Shimadzu, Japão) a 25 °C. As leituras foram realizadas em triplicata e a linha de base foi corrigida utilizando a própria solução de OPA como branco. Uma curva padrão foi preparada com alíquotas de 30 a 450 μL de uma solução 1 mM de L-leucina (131,17 g mol^{-1}) adicionadas à solução de OPA, resultando em $\epsilon = 6070 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($R^2 = 0,9966$). De posse desses valores, o GH_{OPA} ao final de cada ensaio foi calculado utilizando as Eqs. (5) e (6).

3.3.3 Planejamento experimental de Doehlert e análise do modelo estatístico

Baseado em testes preliminares, o planejamento experimental uniforme de Doehlert (1970) foi selecionado para estudar o efeito das seguintes variáveis de processo na hidrólise de FSF por Alcalase®: temperatura (T), razão enzima/substrato (m/m) (E/S) e pH . Essa matriz permite que os fatores sejam avaliados mediante diferente número de níveis entre si; neste trabalho, as variáveis foram avaliadas da seguinte forma: T em 5 níveis, E/S em 7 e o pH em 3. O número de pontos experimentais (N) para 3 fatores na matriz de Doehlert é 13 e o ensaio no ponto central do domínio experimental foi executado em triplicata para a estimativa da variância residual. Os ensaios realizados em ordem aleatória para quebrar um possível viés nos resultados, interrompendo a hidrólise após 90 min de reação. As correspondentes condições em que foram realizados estão apresentadas na TABELA 1.

Um modelo quadrático completo incluindo os termos de interação binária (10 coeficientes no total) foi aplicado para descrever o efeito das variáveis de processo selecionadas na hidrólise de FSF por Alcalase® (Eq. (7)). Os valores de GH obtidos pelo método OPA foram utilizados para calcular os coeficientes do modelo estatístico.

$$GH_{OPA} = a_0 + \sum_{i=1}^3 a_i X_i + \sum_{i=1}^3 a_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 a_{ij} X_i X_j \quad (7)$$

onde a_0 é a intercessão, as variáveis X_i são as variáveis independentes codificadas (fatores), as variáveis a_i são os coeficientes lineares, a_{ii} são os coeficientes quadráticos e a_{ij} são os coeficientes de interação binária. Os valores de GH_{OPA} calculados com este modelo são válidos apenas dentro do domínio experimental. O modelo obtido foi usado para calcular as condições de processo (desejabilidade) dentro desses intervalos de modo a maximizar o GH_{OPA} utilizando o método dos mínimos quadrados. As condições ideais foram usadas para preparar novas amostras de HFSF variando a duração da hidrólise: 60, 90 ou 120 min. Esses hidrolisados foram selecionados para todas as análises posteriores e nomeados como HFSF60, HFSF90 e HFSF120.

TABELA 1 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE DOEHLERT COM 3 FATORES PARA A HIDRÓLISE DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO POR ALCALASE®.

Ensaio	Valores experimentais (valores codificados)		
	Temperatura (°C)	E/S (%)	pH
	X_1	X_2	X_3
1	58,0 (0)	5,0 (0)	8,0 (0)
2	58,0 (0)	5,0 (0)	8,0 (0)
3	58,0 (0)	5,0 (0)	8,0 (0)
4	66,0 (1)	5,0 (0)	8,0 (0)
5	62,0 (0,5)	6,5 (0,866)	8,0 (0)
6	62,0 (0,5)	5,5 (0,289)	8,5 (0,817)
7	50,0 (−1)	5,0 (0)	8,0 (0)
8	54,0 (−0,5)	3,5 (−0,866)	8,0 (0)
9	54,0 (−0,5)	4,5 (−0,289)	7,5 (−0,817)
10	62,0 (0,5)	3,5 (−0,866)	8,0 (0)
11	62,0 (0,5)	4,5 (−0,289)	7,5 (−0,817)
12	54,0 (−0,5)	6,5 (0,866)	8,0 (0)
13	58,0 (0)	6,0 (0,577)	7,5 (−0,817)
14	54,0 (−0,5)	5,5 (0,289)	8,5 (0,817)
15	58,0 (0)	4,0 (−0,577)	8,5 (0,817)

3.3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio em presença de tricina (SDS-Tricina-PAGE)

O perfil eletroforético das amostras de HFSF foi determinado por SDS-Tricina-PAGE de acordo com Schagger (2006). As amostras foram preparadas em

tampão (2% dodecil sulfato de sódio (SDS) (m/v), 5% 2-mercaptoetanol (v/v), 10% glicerol (m/v), 0,015% azul de bromofenol e 150 mM de Tris/HCl pH 6,8) e incubadas a 100 °C por 5 min antes de serem carregadas em gel pré-moldado sem ureia. Os géis foram coloridos com corante Coomassie™ e descoloridos com solução de ácido acético/metanol/água. O kit de calibração Amersham LMW contendo fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa) foi carregado na tira de massa molecular. As corridas de eletroforese foram executadas a 130 a 170 V por 1,5 h.

3.3.5 Conteúdo de heme nos hidrolisados

O conteúdo de heme liberada durante a hidrólise foi determinado pelo ensaio da piridina-hemocromogênio (BARR; GUO, 2015) com modificações. Uma alíquota de 1,5 mL da solução oxidante (0,2 M NaOH, 40% (v/v) piridina, 500 μ M ferricianeto de potássio) foi adicionada a 1,5 mL de solução de hidrolisado diluída 1:3 em uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico e varrida no espectrofotômetro UV-Vis no intervalo de 500 a 600 nm. Em seguida, 30 μ L da solução redutora (0,5 M de ditionito de sódio em 0,5 M NaOH) foram adicionados à amostra, conferindo-lhe coloração avermelhada após agitar gentilmente a cubeta com breves toques. Varreduras das amostras reduzidas foram repetidas até que o espectro com o maior pico fosse obtido. A concentração de heme na amostra foi então calculada usando a lei de Beer e o coeficiente de extinção molar para o hemocromo Pyr₂-heme c (30,27 mM⁻¹ cm⁻¹) (BERRY; TRUMPOWER, 1987), correspondente ao pico do espectro reduzido a 550 nm. A solução oxidante foi usada como branco e os resultados foram expressos como mmol de Pyr₂-heme/mg proteína.

3.4 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E DE COR

3.4.1 Análise de cor

Os parâmetros de cor no sistema CIE Lab (L^* = luminosidade, a^* = coordenada de cor no eixo vermelho/verde e b^* = coordenada de cor no eixo amarelo/azul) das amostras de FSF e HFSF foram medidos em um espectrofotômetro de bancada MiniScan XE plus (HunterLab, Alemanha). O croma

(**C**) e o ângulo de tonalidade (***h***^o) foram calculados usando as Eqs. (8) e (9), respectivamente.

$$C = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (8)$$

$$h^{\circ} = \tan^{-1} \left(\frac{b^{*}}{a^{*}} \right) \quad (9)$$

3.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura da FSF e de seus hidrolisados foi investigada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas em um porta-amostras usando fita adesiva dupla-face e revestidas com uma fina camada superficial de ouro utilizando um pulverizador SCD030 (Balzers Union, Reino Unido) e foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura VEGA3 LMU (Tescan, República Tcheca) usando uma tensão aceleradora de 15 kV. As micrografias foram adquiridas em ampliações de 400× e 2000×.

3.5 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A estabilidade e degradação térmica da FSF e de seus hidrolisados foram estudadas por análise termogravimétrica (TGA) com o auxílio de um sistema de análise térmica Perkin Elmer TGA 4000 (Perkin Elmer Inc., EUA) seguindo o procedimento descrito por CARPINÉ e colaboradores (2015) com algumas modificações. Uma amostra de aproximadamente 15 mg de FSF e amostras de HFSF pesando em torno de 5 mg foram colocadas em placas abertas de platina de alta temperatura (HT Pt) e varridas de 30 a 995 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. Ar sintético foi usado como gás de purga a uma vazão de 10 mL/min.

3.6 ANÁLISE DA ESTRUTURA QUÍMICA DOS HIDROLISADOS

3.6.1 Espectros de absorção ultravioleta

Amostras de HFSF foram dispersas em tampão fosfato 10 mM (pH 7,4) para uma concentração de 0,1 mg/mL. Enquanto isso, para a amostra de FSF, uma dispersão de 25 mg/mL foi preparada, vortexada e centrifugada a 3493 × g por

10 min. O sobrenadante contendo a fração solúvel da FSF foi coletado e diluído 1:2 no mesmo tampão. Então, uma alíquota de 2,5 mL de cada uma das quatro amostras foi varrida no espectrofotômetro UV-Vis no intervalo de 190 a 400 nm.

3.6.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Discos finos contendo as amostras de FSF ou HFSF diluídas em KBr foram analisados pela técnica de espectroscopia por refletância difusa no infravermelho médio com transformada de Fourier (DRIFTS) em um espectrofotômetro Vertex 70 (Bruker, EUA). Cada amostra foi varrida na faixa de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} com resolução espectral de 4 cm^{-1} e 1024 corridas. Os dados obtidos em refletância (**R**) foram convertidos em valores de absorbância (**A**) usando a Eq. (10):

$$A = \log_{10} \left(\frac{1}{R} \right) \quad (10)$$

3.6.3 Espectroscopia de dicroísmo circular no ultravioleta distante

Amostras de HFSF foram dispersas em tampão fosfato 5 mM (pH 7,4) para uma concentração de 0,1 mg/mL. Enquanto isso, para a FSF, uma dispersão de 10 mg/mL foi preparada no mesmo tampão, vortexada e centrifugada a $3493 \times g$ por 10 min, e então o sobrenadante foi coletado para a análise do conteúdo de proteína solúvel. As amostras foram varridas a 25 °C no intervalo de 195 a 300 nm em um espectropolarímetro J-815 (JASCO, EUA) acoplado a um controlador de temperatura usando cubetas com caminho ótico de 0,1 cm. Os espectros de dicroísmo circular (DC) foram registrados com resolução espectral de 0,5 nm e a linha de base foi corrigida ao subtrair o espectro do tampão (SANCHUKI *et al.*, 2016). As composições de estruturas secundárias foram estimadas a partir dos dados de DC pelo método CONTINLL usando o *software* CDPPro (SREERAMA; WOODY, 2000) seguindo o procedimento de KASPCHAK e colaboradores (2017).

3.7 PROPRIEDADES FUNCIONAIS

3.7.1 Capacidade de retenção de óleo

A capacidade de retenção de óleo (CRO) foi determinada de acordo com TEIXEIRA e colaboradores (2018) com modificações. Aproximadamente 100 mg de FSF ou HFSF foram pesadas em tubos de 5 mL. Então, 4 mL de óleo de girassol foram adicionados. Após 30 min de repouso com leve agitação a cada 10 min, as amostras foram centrifugadas a $4211 \times g$ em uma centrífuga refrigerada de bancada Hermle Z383K (Hermle Labortechnik GmbH, Alemanha) por 10 min e inclinadas a 45° por 2 min para drenar o óleo. Os tubos foram novamente pesados para que a **CRO** fosse calculada pela Eq. (11):

$$CRO (g/g) = \left(\frac{m_f - m_t - m_s}{m_s} \right) \quad (11)$$

Onde m_f é a massa final após drenar o óleo, m_t é a massa do tubo vazio e m_s é a massa de amostra. Os resultados foram expressos em mL óleo/g proteína usando 0,891 g/mL como a densidade do óleo de girassol.

3.7.2 Propriedades de espuma

Soluções contendo 1% (m/v) de HFSF ou PIS foram preparadas em triplicata em provetas de 50 mL adicionando aproximadamente 80 mg de amostra a 8 mL de soluções 0,5 M de NaCl em água deionizada e valores de pH ajustados para 4, 7 ou 10. As soluções foram submetidas a 15.000 rpm por 2 min em um homogeneizador Polytron PT 3100 D (Kinematica, Suíça). O volume das espumas foi medido 30 s após a agitação e, novamente, após 1 h de repouso. Baseado no método de COFFMANN e GARCIA (1977), a espumabilidade (**CE**) e a estabilidade da espuma (**EE**) foram expressos, respectivamente, como o aumento percentual de volume e a porcentagem do volume restante em relação ao volume inicial de espuma usando as Eqs. (12) e (13).

$$CE (\%) = 100 \times \left(\frac{V_1 - V_0}{V_0} \right) \quad (12)$$

$$EE (\%) = 100 \times \left(\frac{V_2 - V_1}{V_1 - V_0} \right) \quad (13)$$

onde V_0 é o volume inicial (8 mL), V_1 é o volume 30 s após o batimento e V_2 é o volume 60 min após a formação das espumas.

3.7.3 Propriedades emulsificantes

3.7.3.1 Atividade e estabilidade das emulsões O/A

Emulsões óleo/água (O/A) foram preparadas por homogeneização de 5 mL de óleo de girassol com 15 mL de soluções 0,5 M de NaCl contendo 1% de HFSF ou PIS a 20.000 rpm por 3 min. O índice de atividade emulsificante (IAE) e o índice de estabilidade da emulsão (IEE) foram determinados de acordo com PEARCE e KINSELLA (1978) com modificações. Alíquotas de 30 μ L de cada emulsão coletadas imediatamente ou 10 min após a homogeneização foram adicionadas a 3 mL de uma solução 0,1% (m/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) em uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm. A absorbância foi medida no espectrofotômetro UV-Vis a 500 nm a 25 °C e seus valores foram usados para calcular a **IAE** e a **IEE** usando as Eqs. (14) e (15), respectivamente:

$$IAE (m^2 g^{-1}) = \frac{2 \times 2.303 \times A_{E0}}{F \times M_p} \quad (14)$$

$$IEE (min) = \frac{A_{E10} \times \Delta t}{\Delta A} \quad (15)$$

Onde **F** é a fração volumétrica de óleo (0,25), **M_p** é a massa de proteína da amostra, **A_{E0}** é a absorbância inicial, **A_{E10}** é a absorbância lida 10 min após a homogeneização, **Δt** é o intervalo de tempo entre as leituras (10 min) e **ΔA** é a diferença entre as absorbâncias inicial e final.

3.7.3.2 Microscopia ótica

O comportamento da estabilidade e do tamanho das gotas das emulsões foi verificado por microscopia ótica de acordo com TEIXEIRA e colaboradores (2018) com modificações. Após a homogeneização, alíquotas de 4 mL de cada emulsão foram transferidas para dois tubos graduados de 5 mL. Um tubo foi armazenado a 4 °C e o segundo tubo foi armazenado a 20 °C ao abrigo da luz. As emulsões foram observadas em um microscópio invertido Zeiss Axio Observer D1 (Zeiss Vision GmbH, Alemanha) imediatamente após a homogeneização e nos dias 3 e 7 após a formação das emulsões. As micrografias adquiridas em ampliação de 160 \times usando o

software Axio Vision v4.8.2 foram analisadas com o *software* ImageJ para se determinar a distribuição de diâmetro de gotas (DDG) efetuando-se medições de pelo menos 100 gotas por amostra de emulsão.

3.7.4 Propriedades antioxidantes dos hidrolisados

A análise de FRAP foi realizada de acordo com o método descrito por BENZIE e STRAIN (1996) com modificações (BARBI *et al.*, 2018). Absorbâncias lidas a 593 nm foram medidas em um leitor de microplacas Infinite M200 NanoQuant (Tecan trading AG, Suíça) e os resultados foram expressos como μmol de equivalentes de Trolox (TE) por grama de amostra usando uma curva padrão preparada com soluções de Trolox com concentrações de 0,025 a 0,7 mmol/L ($R^2 = 0,9895$).

A capacidade de captura do radical ABTS $\bullet+$ das amostras de HFSF foi determinada pelo método descrito por RE e colaboradores (1999) com modificações (BARBI *et al.*, 2018). A solução de radical catiônico ABTS $\bullet+$ preparada no dia anterior foi diluída em metanol para uma concentração cuja absorbância a 734 nm fosse ajustada para $0,700 \pm 0,020$, testada em um espectrofotômetro Spectro 3000W UV-Vis (Marte Científica, Brasil). As absorbâncias lidas a 734 nm foram comparadas com uma curva padrão de soluções de Trolox com concentrações de 0,1 a 0,8 mmol/L ($R^2 = 0,9870$). Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol TE/g}$ amostra.

A capacidade de captura do radical DPPH \bullet foi quantificada pelo método de BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET (1995) com modificações (BARBI *et al.*, 2018). Leituras de absorbância a 517 nm foram comparadas com uma curva padrão preparada com soluções de Trolox com concentrações de 0,1 a 1,0 mmol/L ($R^2 = 0,9930$) e os resultados foram expressos como $\mu\text{mol TE/g}$ amostra.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada usando o *software* Statistica 12.0 (StatSoftTM Inc.); as médias foram comparadas usando análise de variância (ANOVA) e suas diferenças foram analisadas usando o teste de Duncan com nível de significância de 5%. Os gráficos apresentados foram plotados usando o *software* OriginPro 8.6 (Originlab Corporation).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FARINHA DE SANGUE DE FRANGO

As composições centesimal e mineral da FSF estão apresentadas na TABELA 2. Os resultados da composição química indicam que a FSF tem alto conteúdo de proteína (93,42%) e é rica em ferro (1.290,28 mg/kg). Conteúdos elevados de proteína também foram reportados por SORAPUKDEE e NARUNATSOPANON (2017) para sangue de frango (88,27%), sangue de pato (89,70%) e sangue de porco (90,97%). No entanto, o conteúdo de cinzas totais (3,67%) encontrado neste trabalho foi inferior aos relatados por outros autores para o sangue de frango desidratado (entre 10 e 18%) (HUANG; LIU, 2010; SORAPUKDEE; NARUNATSOPANON, 2017). É importante ressaltar que a matéria-prima na produção de FSF é um subproduto de abatedouro, então os valores de composição centesimal podem variar significativamente de acordo com a espécie, a dieta e as condições de criação do animal. Também influenciam na composição da FSF possíveis contaminantes presentes na cadeia de produção da farinha de sangue, como penas, ossos e vísceras ou outros subprodutos oriundos do abate de outros animais.

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E MINERAL DA FARINHA DE SANGUE DE FRANGO LIOFILIZADA.

Composição centesimal	%* (m/m)
Proteína bruta	93,42 ± 1,57
Cinzas totais	3,67 ± 0,44
Umidade residual	1,84 ± 0,07
Mineral	mg/kg*
Ferro	1.290,28 ± 54,27
Magnésio	230,32 ± 3,30
Zinco	38,58 ± 0,19
Cobre	6,50 ± 0,01
Manganês	2,18 ± 0,09
Cromo	< 0,10
Selênio	< 0,10

* Os valores representam médias ± erros padrões das análises em triplicata (n = 3).

Com relação ao conteúdo mineral, o ferro foi quantitativamente o mineral majoritário na composição da FSF, seguido de magnésio, zinco e cobre. Deve-se lembrar de que ferro nos alimentos ocorre na forma heme e não-heme, ambos com diferentes taxas de absorção (15 a 35% e 2 a 20%, respectivamente) (MONSEN, 1988). De acordo com SORAPUKDEE e NARUNATSOPANON (2017), o sangue de frango possui ferro não-heme em proporção muito superior à de ferro heme (70,81%), então, é possível dizer que, apesar da FSF ser rica em ferro, sua biodisponibilidade pode ser limitada. Apesar disso, esses resultados indicam que FSF tem potencial como uma fonte atrativa de proteína e ferro, podendo ser utilizada em suplementação ou como ingrediente em formulações alimentícias.

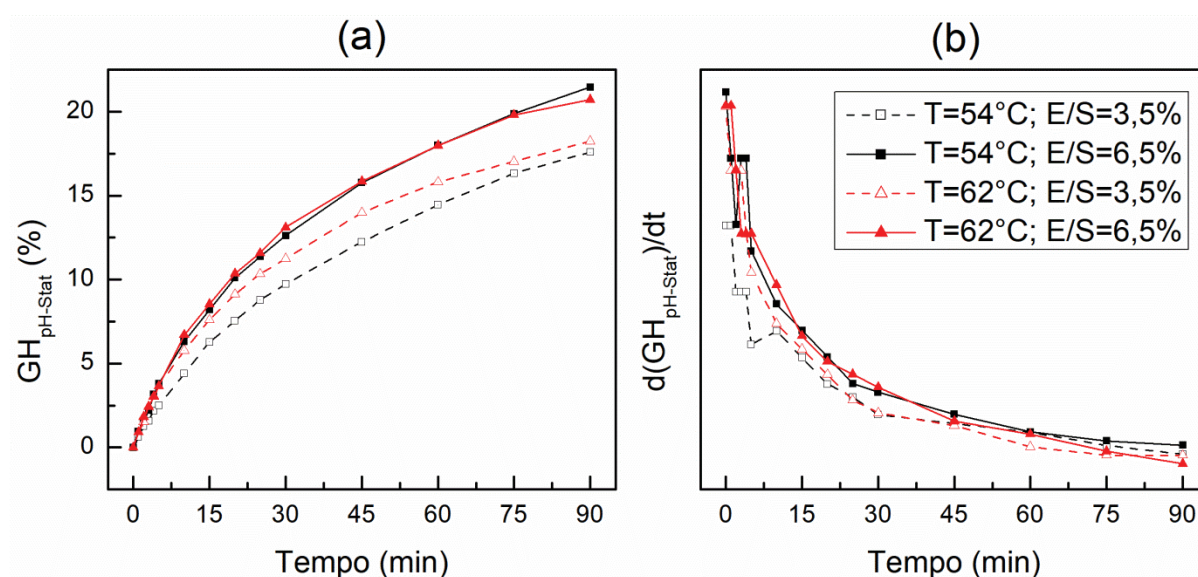
Outro fator importante a ser levado em conta na composição de materiais hidrolisáveis é a presença de inibidores enzimáticos. No caso dos minerais analisados neste estudo, nenhum deles prejudica a atividade enzimática da Alcalase®. Segundo GRAYCAR e colaboradores (2013), outro mineral como o cálcio auxilia na hidrólise com subtilisinas (classificação à que pertence a Alcalase®), devido à sua ação estabilizante conferida à estrutura da enzima.

4.2 HIDRÓLISE DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO

O monitoramento do GH é crucial para compreender o mecanismo cinético da reação de hidrólise. O método pH-Stat se mostrou adequado para obter curvas de hidrólise por ser rápido e prático, o que permitiu a análise da cinética do processo. A FIGURA 6A mostra os perfis de $GH_{pH-Stat}$ da hidrólise enzimática de FSF em quatro condições experimentais usadas no planejamento experimental de Doehlert. Como se pode observar, a concentração de enzima tem um papel importante na velocidade da reação, relacionada à primeira derivada no tempo do $GH_{pH-Stat}$ (FIGURA 6B). Para as duas temperaturas comparadas, um aumento na E/S levou a um maior $GH_{pH-Stat}$ final e maiores velocidades iniciais de reação. Entretanto, a diferença de velocidade de reação decresce lentamente até um ponto em que se torna inferior ao que é observado para as reações conduzidas com menor E/S . Portanto, a atividade da Alcalase® é maior quando a E/S também é maior. Porém, isso é válido somente durante os primeiros minutos do processo. Enquanto a FSF é esgotada, o estado inicial de substrato infinito onde todos os sítios ativos da enzima estão ocupados passa para a condição em que a velocidade de reação é

controlada e limitada pela concentração de substrato. Essa transição ocorre mais precocemente para valores superiores de E/S (velocidades iniciais de reação maiores). Esse resultado também foi relatado na hidrólise de proteína de coco (THAIPHANIT; SCHLEINING; ANPRUNG, 2016). De acordo com a aplicação desejada, a velocidade de reação e o GH requerido podem ser controlados pela escolha da concentração inicial de enzima, que produzem impacto significativo nas propriedades resultantes dos hidrolisados obtidos.

FIGURA 6 – PERFIS DE GRAU DE HIDRÓLISE E SUA DERIVADA OBTIDOS PELO MÉTODO PH-STAT COM HIDRÓLISE EM DIFERENTES TEMPERATURAS E CONCENTRAÇÕES DE ENZIMA.



Enquanto o método pH-Stat foi usado para estudar a cinética da reação de hidrólise, o método do OPA foi usado para avaliar o GH final para o ajuste dos parâmetros do modelo estatístico proposto utilizando os resultados obtidos do planejamento experimental de Doehlert. Os valores de GH obtidos pelos dois métodos estão apresentados na TABELA 3. Ambos os métodos possuem a vantagem de não apresentarem longas etapas de incubação e de serem capazes de monitorar o GH em tempo real, porém, comparando um com outro ou com outros métodos, o OPA é preferível para muitos substratos (SILVESTRE *et al.*, 2013; SPELLMAN *et al.*, 2003).

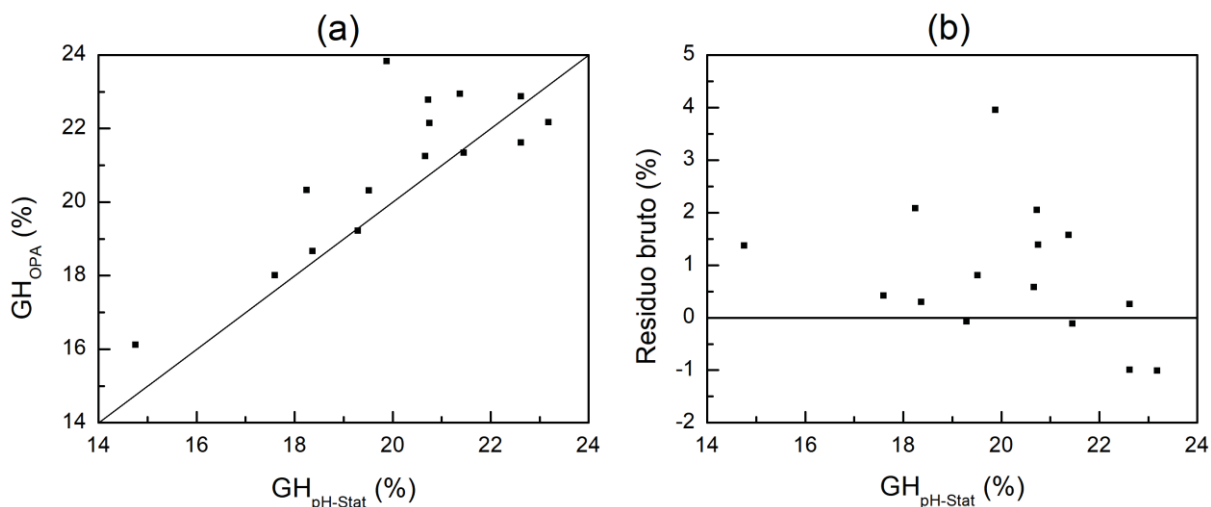
TABELA 3 – RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE DOEHLERT PARA A HIDRÓLISE DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO

Ensaio	Condições experimentais (T, E/S, pH)	Valores determinados (90 min de hidrólise)	
		GH _{pH-stat} (%)	GH _{OPA} (%)
1 ^(a)	58,0 °C / 5,0% / 8,0	19,3	19,2
2 ^(a)	58,0 °C / 5,0% / 8,0	20,8	22,1
3 ^(a)	58,0 °C / 5,0% / 8,0	20,7	21,2
4	66,0 °C / 5,0% / 8,0	19,5	20,3
5	62,0 °C / 6,5% / 8,0	20,7	22,8
6	62,0 °C / 5,5% / 8,5	21,4	22,9
7	50,0 °C / 5,0% / 8,0	18,4	18,7
8	54,0 °C / 3,5% / 8,0	17,6	18,0
9 ^(b)	54,0 °C / 4,5% / 7,5	14,7	16,1
10	62,0 °C / 3,5% / 8,0	18,2	20,3
11	62,0 °C / 4,5% / 7,5	22,6	22,9
12	54,0 °C / 6,5% / 8,0	22,6	21,6
13	58,0 °C / 6,0% / 7,5	23,2	22,2
14 ^(c)	54,0 °C / 5,5% / 8,5	19,9	23,8
15	58,0 °C / 4,0% / 8,5	21,4	21,3

T – temperatura; E/S – razão enzima/substrato (m/m); GH_{pH-Stat} e GH_{OPA}: grau de hidrólise determinado pelo método pH-Stat e do orto-ftaldialdeído (OPA), respectivamente. (a): ensaios conduzidos no ponto central do planejamento; (b) e (c) ensaios que resultaram, respectivamente, no menor e no maior grau de hidrólise segundo o método do OPA.

A **Erro! Autoreferência de indicador não válida.** mostra que, nas condições usadas nos ensaios, os valores de GH obtidos pelo método do OPA tendem a ser mais altos do que aqueles obtidos pelo método pH-Stat. Peptídeos menores e aminoácidos livres possuem *pK* significativamente superior comparado a peptídeos de cadeias mais longas e proteínas, fazendo com que o termo $1/\alpha$ da equação do pH-Stat seja subestimado, consequentemente subestimando o valor do GH, o que pode explicar a tendência dos resultados observada. Essa característica é ainda mais evidente quando a enzima empregada é uma exopeptidase, como foi relatado por SPELLMAN e colaboradores (2003). O método do OPA, no entanto, também possui suas limitações. A natureza do substrato é muito importante ao considerar usar esse método; a reatividade do OPA com cisteína e prolina é baixa, o que faz com que o GH seja subestimado quando o substrato é rico nesses resíduos de aminoácidos, enquanto altos níveis de lisina resultam em um GH superestimado porque o OPA reage com grupos amina da cadeia lateral desse resíduo (CHURCH *et al.*, 1983; NIELSEN; PETERSEN; DAMBMANN, 2001; RUTHERFURD, 2010).

FIGURA 7 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS PH-STAT E OPA PARA A DETERMINAÇÃO DO GRAU DE HIDRÓLISE.



O planejamento experimental de Doehlert foi usado para investigar a influência das variáveis de processo no GH_{OPA} . Considerando um modelo quadrático completo com a temperatura (T), pH e a razão (m/m) enzima/substrato (E/S) como variáveis independentes, a análise de variância (ANOVA) mostrou que apenas o coeficiente linear da E/S e a interação entre T e pH foram significativos ($p < 0,05$) (**Erro! Autoreferência de indicador não válida.**). Alcalase® é uma serina protease, uma classe de enzimas cuja atividade é conhecida por apresentar um comportamento cinético de Michaelis-Menten (HEDSTROM, 2002; JAHANBANI *et al.*, 2018). Considerando que, para a E/S , somente o coeficiente linear a_2 é significativo, é possível afirmar que as concentrações iniciais de enzima usadas eram inferiores ao seu ponto de saturação. Foi observado que há um efeito anti-sinérgico entre T e pH , pois sua interação foi significativa e possui valor negativo. Isso significa que, um aumento na temperatura deve estar acompanhado da redução do pH para que se obtenha o mesmo ou um GH maior. Do ponto de vista técnico, essa característica do processo é interessante, pois a hidrólise pode então ser conduzida a uma temperatura mais baixa e um pH mais elevado para se obter um GH elevado. Já para a hidrólise de subprodutos de salmão, GBOGOURI e colaboradores (2004) tiveram observações diferentes; a variável mais importante foi o pH e a interação entre T e E/S foi significativa e com efeito negativo.

TABELA 4 – PARÂMETROS E COEFICIENTES DE REGRESSÃO DO MODELO ESTATÍSTICO PARA DESCREVER O GH_{OPA} NA HIDRÓLISE DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO (FSF) POR ALCALASE® OBTIDO COM BASE NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE DOEHLERT.

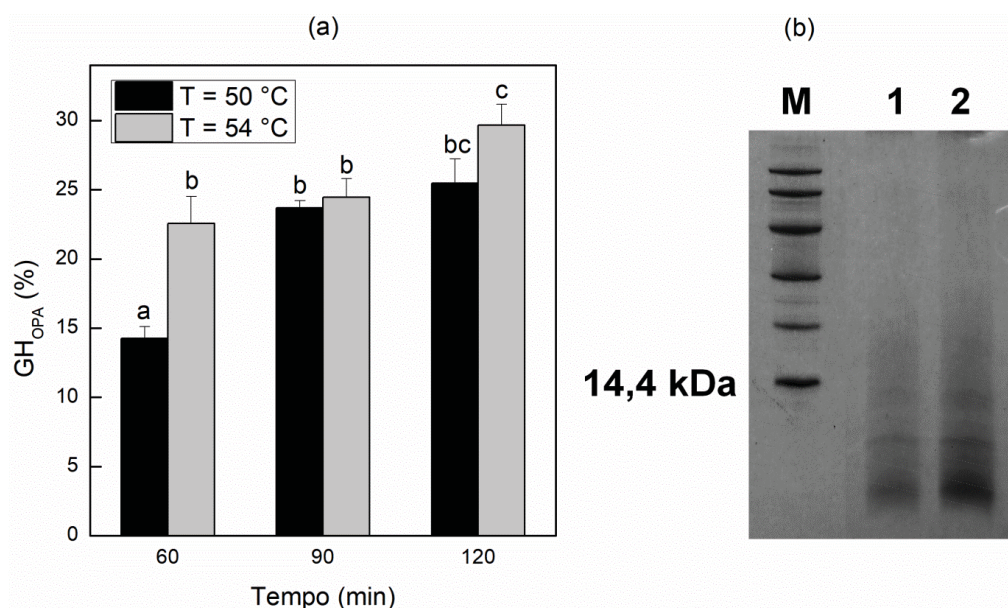
	Modelo quadrático completo		Modelo reduzido	
R ²	0,872		0,760	
MS Residual	0,0001642		0,0001536	
Parâmetros	Coeficiente de regressão	p	Coeficiente de regressão	p
Intercessão (a_0)	0,209 ± 0,007	< 0,001	0,209 ± 0,003	< 0,001
Linear				
T (a_1)	0,008 ± 0,003	0,056	0,016 ± 0,006	0,029*
E/S (a_2)	0,017 ± 0,006	0,027*	0,020 ± 0,006	0,009*
pH (a_3)	0,012 ± 0,007	0,078	0,014 ± 0,006	0,045*
Quadrático				
T ² (a_{11})	-0,003 ± 0,003	0,292	-	-
(E/S) ² (a_{22})	0,002 ± 0,009	0,862	-	-
pH ² (a_{33})	0,009 ± 0,007	0,291	-	-
Interação				
T*(E/S) (a_{12})	-0,003 ± 0,006	0,669	-	-
T*pH (a_{13})	-0,018 ± 0,007	0,044*	-0,047 ± 0,015	0,012*
(E/S)*pH (a_{23})	0,001 ± 0,012	0,944	-	-

* Parâmetros significativos a um nível de confiança de 95%; todos os coeficientes de regressão estão apresentados como valores numéricos ± erros padrão.

As condições ótimas para a hidrólise de FSF para o máximo GH_{OPA} (desejabilidade) foram calculadas usando o método dos mínimos quadrados, resultando em 50 °C, 6,5% E/S e pH 8,5 com um GH_{OPA} predito de 26,1%. Essas condições, no entanto, correspondem aos extremos do intervalo de cada variável e estão fora do domínio experimental analisado no planejamento experimental (lembrar que a matriz de Doehlert tem formato de cuboctaedro e não de um cubo). Assim, como esperado, o GH_{OPA} experimental após 90 min de hidrólise nessas condições (23,7% ± 0,5%) é visivelmente inferior ao valor predito. Isso se deve ao fato de que a temperatura mais baixa desfavorece a cinética da reação, o que não é levado em conta pelo modelo. A hidrólise foi então novamente realizada um nível de temperatura acima daquele (54 °C). Nas novas condições, o GH_{OPA} predito é de 26,0% e o valor observado foi de 24,5% ± 1,3%. Assim, o modelo proposto pode ser usado como uma ferramenta para determinar as condições de processo que resultem no GH desejado. Controlar o GH do processo é importante para ajustar as propriedades físico-químicas dos hidrolisados e para evitar características sensoriais indesejáveis como o sabor amargo (CHEUNG *et al.*, 2015), cuja percepção em

hidrolisados está relacionada à presença de níveis altos de resíduos de aminoácidos aromáticos ou hidrofóbicos como Leu, Tyr, Ala, Phe e Trp (HUMISKI; ALUKO, 2007), e esse efeito é mais pronunciado quando estão localizados em posições endo de peptídeos de cadeia longa ou na posição terminal de peptídeos curtos (LIU *et al.*, 2016).

FIGURA 8 – RESULTADOS DA HIDRÓLISE DA FARINHA DE SANGUE DE FRANGO NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE PROCESSO.



Avaliação do efeito da temperatura e da duração da reação no grau de hidrólise (a): as letras minúsculas representam os grupos de amostras classificados pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). (b) gel da SDS-Tricina-PAGE manchado indicando o perfil eletroforético dos hidrolisados obtidos a 90 (1) e 120 (2) min a 54 °C. “M” indica a coluna onde foi injetado o padrão; 1 e 2 se referem às colunas do HFSF90 e HFSF120, respectivamente.

Além disso, também foi avaliado o efeito da duração da hidrólise no GH comparando as temperaturas de 50 e 54 °C, como mostra a FIGURA 8A. Aplicando o teste de Duncan, foi observado que a diferença de temperatura foi significativa apenas para 60 min de hidrólise ($p < 0,05$), o que está de acordo com as observações anteriores acerca da cinética da hidrólise. Em uma temperatura superior, a velocidade de reação é inicialmente maior e se torna controlada pela concentração de substrato mais precocemente. Com respeito à duração da hidrólise, entre os ensaios de 90 e 120 min, a diferença não foi significativa ($p > 0,05$) a 50 °C. Isso indica que, para alcançar um GH significativamente maior nessa temperatura, uma segunda etapa de hidrólise onde enzima é adicionada ou onde as condições são alteradas para executar a hidrólise empregando uma exopeptidase pode resultar em uma hidrólise estendida satisfatória. Para as análises subsequentes, os hidrolisados obtidos pela hidrólise a 54 °C foram selecionados por apresentarem GH maior que

aqueles obtidos pela reação a 50 °C e serão referidos como HFSF60, HFSF90 e HFSF120 de acordo com sua duração de hidrólise correspondente.

Depois de manchados, os géis Tris-Tricina da eletroforese confirmaram a decomposição da FSF em cadeias pequenas de peptídeos. Apenas bandas abaixo de 14,4 kDa foram observadas, o que significa que a FSF é altamente digerível pela Alcalase® e a hidrólise extensiva ocorreu apesar de ter sido conduzida de 60 a 120 min. Aumentando a duração da hidrólise levou a bandas de baixa massa molecular (MM) mais intensas. A diferença entre as colunas foi mais evidente entre as amostras HFSF90 e HFSF120 (FIGURA 8B, colunas 1 e 2), indicando que estender a hidrólise a 54 °C além de 90 min resultou em peptídeos ainda menores como esperado. Essa tendência também foi observada na hidrólise de proteína isolada de amendoim (GH de 0,1 a 8,3%) (CHEN *et al.*, 2018) e HALL e colaboradores (2017) também obtiveram peptídeos de baixa MM em hidrolisados de proteína de grilo-doméstico da Índia obtidos por hidrólise por Alcalase® após 30 a 90 min.

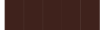



O conteúdo de heme nos hidrolisados foi determinado pelo método da piridina-hemocromogênio (Pyr₂-heme). Pyr₂-heme é um hemocromo, isto é, um complexo nitrogenado de ferro-porfirina (BERRY; TRUMPOWER, 1987). Isso é um importante parâmetro para avaliar quão efetiva a hidrólise foi em liberar ferro heme. HFSF60, HFSF90 e HFSF120 apresentaram 344,7, 372,2 e 407,4 mmol Pyr₂-heme/mg proteína, respectivamente. Os coeficientes de correlação de Pearson calculados revelaram que há uma forte correlação positiva do conteúdo de heme com tanto o GH como a duração da hidrólise. A correlação com a duração da hidrólise ($r = 0,998$) foi levemente maior que com o GH ($r = 0,982$). Portanto, estar a correlação entre o GH ou a duração da hidrólise com o conteúdo de heme liberado durante o processo utilizando uma faixa de valores maior pode ser necessário para confirmar se o GH ou o tempo de hidrólise são os responsáveis pela liberação de heme ou se ambos são importantes. Isso porque em aplicações onde a presença de heme é importante, pode ser necessário alterar as condições de processo para alcançar um GH maior ou menor em um dado tempo de reação.

4.3 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E DE COR

Os parâmetros de cor do espaço CIE Lab das amostras de FSF e HFSF foram determinados e estão apresentados na TABELA 5. Os resultados mostram

claramente que a cor dos hidrolisados em pó depende da duração da hidrólise, passando de uma cor marrom clara para uma tonalidade mais escura.

TABELA 5 – GRAU DE HIDRÓLISE OBTIDO PELO MÉTODO DO ORTOFTALDIALDEÍDO (GH_{OPA}) E PARÂMETROS DE COR DO ESPAÇO CIE LAB PARA HIDROLISADOS (HFSF) OBTIDOS APÓS 60, 90 E 120 MIN DE HIDRÓLISE.

	FSF 	HFSF60 	HFSF90 	HFSF120 
GH_{OPA} (%)	-	$22,6 \pm 1.9$	$24,5 \pm 1.3$	$29,7 \pm 1.5$
L^*	$17,30 \pm 0.03$	$51,03 \pm 0.00$	$31,75 \pm 0.03$	$23,70 \pm 0.02$
a^*	$12,48 \pm 0.10$	$13,77 \pm 0.02$	$15,88 \pm 0.08$	$10,20 \pm 0.05$
b^*	$10,41 \pm 0.07$	$26,70 \pm 0.01$	$20,12 \pm 0.03$	$10,89 \pm 0.05$
C	$16,25 \pm 0.10$	$30,04 \pm 0.01$	$25,63 \pm 0.07$	$14,92 \pm 0.00$
h° (graus)	$39,84 \pm 0.22$	$62,72 \pm 0.05$	$51,72 \pm 0.12$	$46,86 \pm 0.26$

As tiras coloridas exibidas abaixo do nome de cada amostra foram feitas usando a ferramenta *Colorizer color picker and converter online tool* (<http://colorizer.org/>) para converter os parâmetros de cor CIE Lab para o sistema digital RGB. As medidas estão apresentadas como média \pm erro padrão de uma triplicata ($n = 3$).

Os parâmetros L^* , C e h° foram correlacionados com o conteúdo de heme liberada durante a hidrólise, o GH e com a duração da hidrólise correspondente a cada amostra de HFSF (TABELA 6). Como mostram os resultados, todos os coeficientes possuem valor negativo. Além disso, o conteúdo de heme e a duração da hidrólise tiveram maior correlação com os parâmetros de cor que o GH. Isso indica que a análise de cor dos hidrolisados em pó pode ser uma ferramenta para medir indiretamente o conteúdo de heme liberada durante a hidrólise baseado na duração do processo.

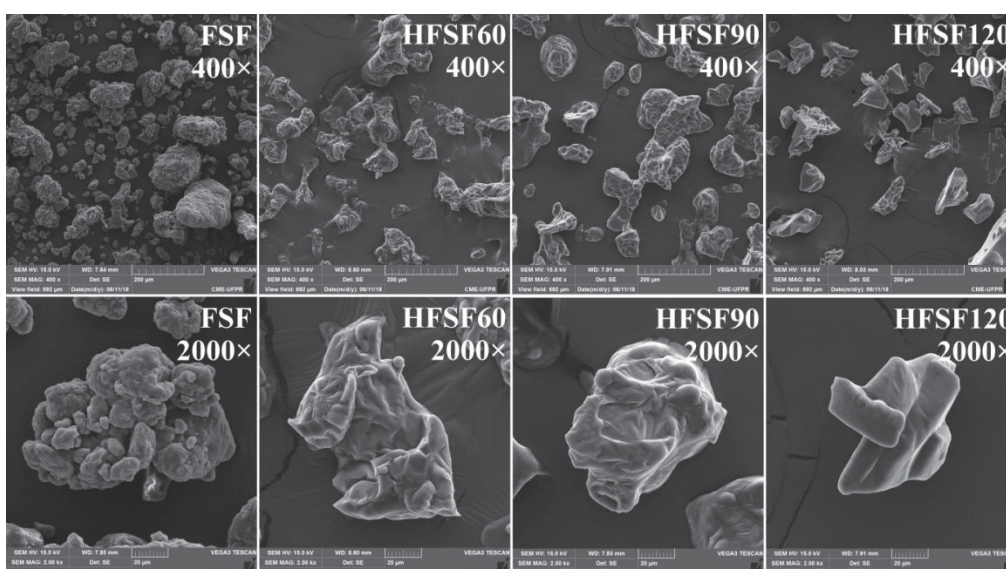
TABELA 6 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE OS PARÂMETROS DE COR DE HIDROLISADOS DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO (HFSF) E O CONTEÚDO DE HEME LIBERADA DURANTE A HIDRÓLISE, O GRAU DE HIDRÓLISE (GH) E A DURAÇÃO DA HIDRÓLISE.

Parâmetro de cor	Conteúdo de heme	GH	Duração da hidrólise
L^*	-0,954	-0,880	-0,973
C	-0,986	-0,999	-0,972
h°	-0,958	-0,886	-0,976

A microestrutura das amostras em pó de FSF e HFSF foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) com ampliações de $400\times$ e $2000\times$ (FIGURA 9). FSF pode ser descrita como um pó fino composto de aglomerados de diferentes tamanhos e número de partículas agregadas. Já com relação ao material hidrolisado, pouca diferença pode ser observada entre as amostras correspondentes

a 60 e 90 min de hidrólise. Enquanto isso, a amostra HFSF120 é composta por aglomerados com formato mais definido. Em geral, a alta higroscopicidade dos hidrolisados é evidente, pois praticamente não é possível diferenciar um grão do outro nos aglomerados, pois estão envoltos em uma fina camada de umidade. Essa observação está conectada ao fato de que o tratamento enzimático aumenta fortemente a interação proteína-água e, portanto, a solubilidade proteica. Ainda assim, observações ao microscópio fazem parte de uma análise puramente empírica, portanto, qualquer conclusão acerca das imagens obtidas deve ser tomada com ressalvas.

FIGURA 9 – MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DAS AMOSTRAS DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO (FSF) E DE SEUS HIDROLISADOS (HFSF).



4.4 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

Os perfis de degradação térmica (curvas de TGA) e suas primeiras derivadas (curvas de DTG) estão apresentados na FIGURA 10. A hidrólise teve um leve impacto na estabilidade térmica da farinha de sangue. Enquanto as curvas TG/DTG são bastante similares entre os hidrolisados, demonstrando quatro estágios de degradação bem definidos, a FSF apresenta três estágios com um perfil diferente acima de 600 °C.

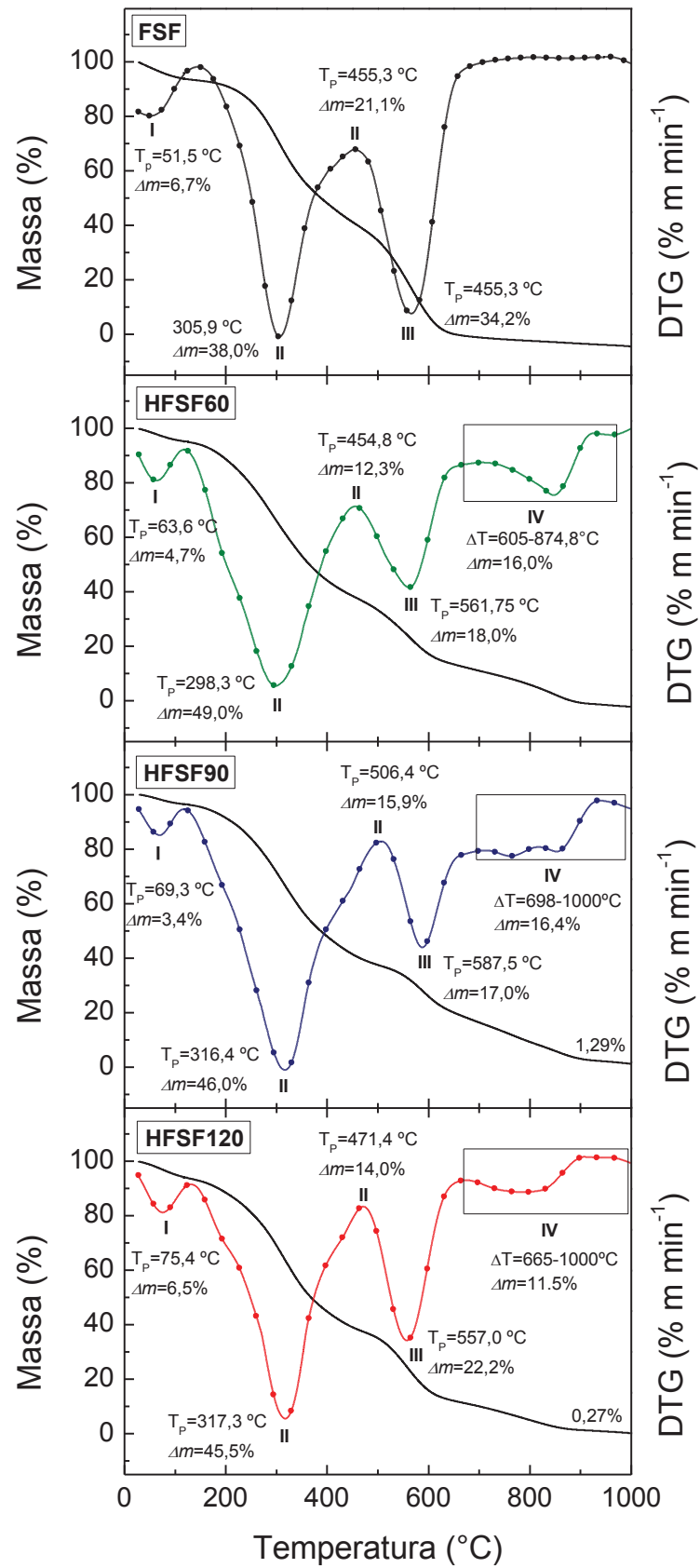
A perda de massa (Δm) inicial foi observada na faixa de temperatura (ΔT) de 30 a 145 °C para a FSF ($\Delta m = 6,8\%$), enquanto os hidrolisados demonstraram em geral faixas mais estreitas (30 a 131 °C) e menor perda de massa nesse estágio (entre 4,71 e 6,50%). O primeiro estágio de perda de massa para todas as amostras

pode ser atribuído à vaporização de água (YOUSEFI; ARIFFIN; HUDA, 2017) e à perda de componentes voláteis. Pela localização do pico nesse estágio, a umidade possui a tendência de ser perdida a temperaturas maiores (63,56 °C, 69,34 °C e 75,36 °C, respectivamente, para HFSF60, HFSF90 e HFSF120) para os hidrolisados do que para a FSF (51,52 °C). Assim, no primeiro estágio, a ΔT mais estreita e a Δm menor estão possivelmente ligados com a desidratação por liofilização ter sido mais eficaz na remoção de umidade residual dos hidrolisados do que da farinha de sangue. Ainda, o aumento da temperatura de pico em função do GH pode ser explicado pela ligação com água por meio de ligações de hidrogênio se tornar mais intensa com a hidrólise, requerendo mais energia térmica para rompê-las.

O segundo estágio de degradação foi marcado pela presença de um pico endotérmico com perda de massa maior que no primeiro estágio, seguido de um evento exotérmico, onde a degradação total ou parcial do material provavelmente ocorreu. Como se pode observar na FIGURA 10, a FSF começou a se decompor a 145 °C e a máxima taxa de perda de massa foi observada a 305,9 °C (pico endotérmico, $\Delta m = 38,0\%$), seguido de um evento exotérmico ($\Delta m = 21,1\%$) a 455,3 °C. O comportamento da degradação dos hidrolisados é o mesmo da FSF. No entanto, um pequeno aumento na estabilidade térmica foi observado quando a duração da hidrólise foi de 120 min, observando o deslocamento dos picos 2 e 3 para 317,26 °C e 471,36 °C, respectivamente. Independente da amostra, a maior perda de massa foi verificada no segundo estágio para o pico endotérmico. Durante esses processos, o aumento da temperatura inicialmente afeta a estabilidade de ligações não-covalentes, em seguida as ligações de hidrogênio e as interações eletrostáticas (exotérmicas por natureza) são desestabilizadas (DAMODARAN, 2017). A continuação do aumento de temperatura na faixa de 100 a 300 °C provoca a quebra de ligações covalentes entre grupos C–N, C(O)–NH, C(O)–NH₂ de resíduos de aminoácidos (LIU; LI; SUN, 2015; NANDA *et al.*, 2007).

O terceiro estágio verificado acima de 490 °C, para todas as amostras, pode ser atribuído à completa decomposição das moléculas de proteína em gases como CO₂, CO, NH₃, H₂S e outros gases (NANDA *et al.*, 2007; YOUSEFI; ARIFFIN; HUDA, 2017). QU e colaboradores (2018) também verificaram que conjugados de dextrana-proteína isolada de colza também apresentaram três etapas de degradação na faixa de 30 a 600 °C, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho.

FIGURA 10 – TERMOGRAMAS DA PERDA DE MASSA E A DERIVADA DO PERFIL TERMOGRAVIMÉTRICO DE AMOSTRAS DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO (FSF) E SEUS HIDROLISADOS (HFSF)

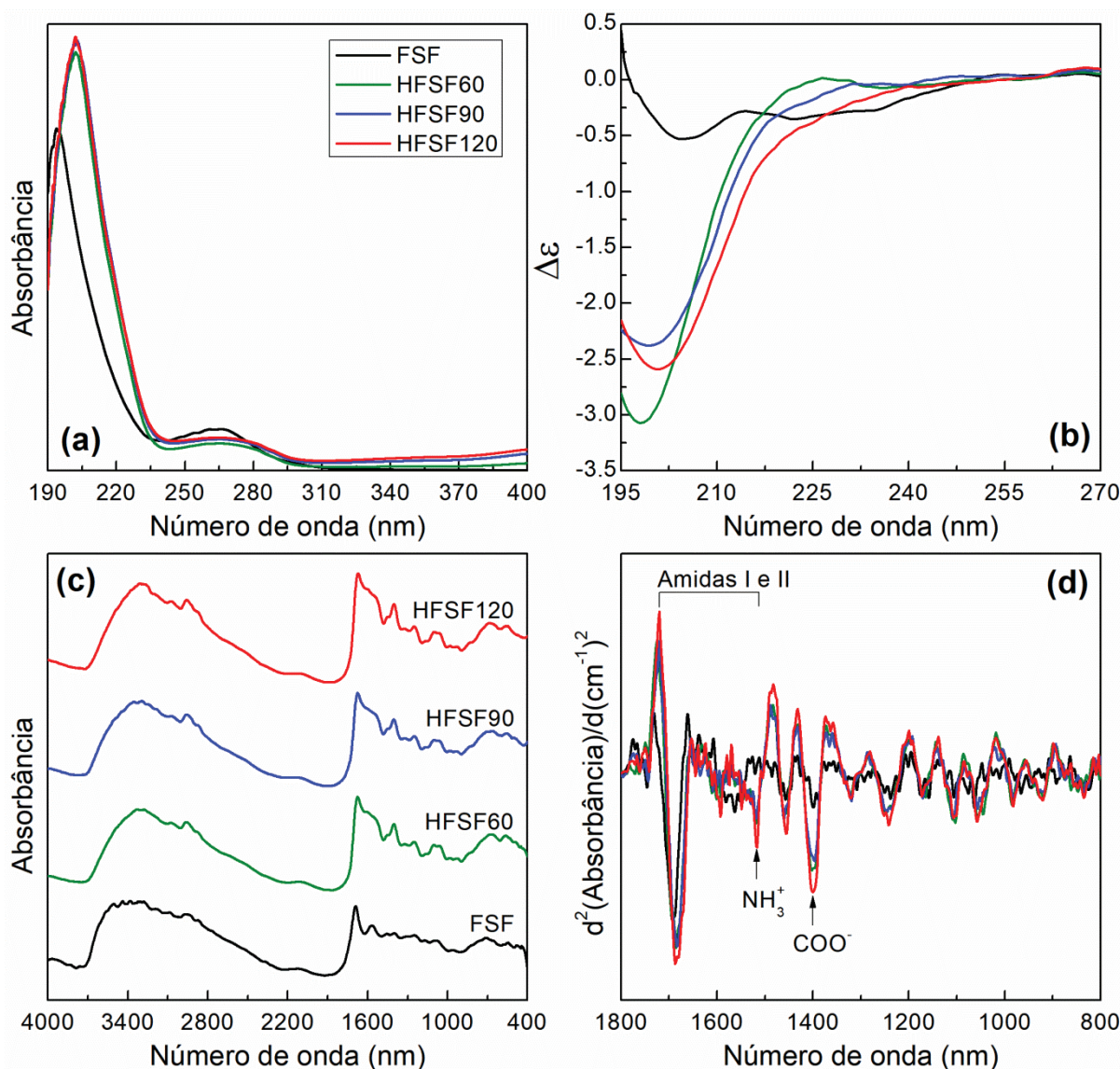


O quarto estágio de degradação térmica foi verificado apenas para as amostras de HFSF. Esse evento ocorreu de 605 a 874 °C (Δm = 16,0%), 698 a 1000 °C (Δm = 16,4%) e 665 a 1000 °C (Δm = 11,5%) para as amostras de HFSF60, HFSF90 e HFSF120, respectivamente, podendo ser atribuído a resíduos da matéria carbonizada (NANDA *et al.*, 2007). Além disso, também é claramente observada a formação de complexos termicamente mais estáveis com o tratamento enzimático da farinha de sangue, uma vez que, a 600 °C, a massa residual de FSF era 5,6%, enquanto que os hidrolisados apresentaram 15 a 26% de massa restante. Esses resultados indicam que a hidrólise melhorou a estabilidade térmica da FSF, assim como foi observado por outros autores para processamentos diferentes, como conjugados de hemicelulose da casca com proteína de soja apresentando 31,3 a 45,6% de massa residual (WANG; WU; LIU, 2017) e colágeno solúvel apresentando 19,2 a 22,3% (YOUSEFI; ARIFFIN; HUDA, 2017) a 600 °C.

4.5 ALTERAÇÕES NA ESTRUTURA QUÍMICA DOS HIDROLISADOS

As alterações na estrutura química dos hidrolisados foram investigadas mediante diferentes métodos espectrométricos. As primeiras observações dizem respeito aos espectros UV (FIGURA 11A) das amostras de HFSF e da fração solúvel de FSF. Pouca diferença se vê entre as amostras de HFSF, mas, comparado ao espectro da FSF, nota-se que a hidrólise resulta no deslocamento do pico a 194 nm para 202 nm. Segundo CANTOR e SCHIMMEL (1980), a alteração está ligada a uma mudança na conformação dos hidrolisados, possivelmente um aumento do número de estruturas aleatórias, isto é, maior desnaturação do conteúdo de proteína da FSF. Um segundo deslocamento é observado para o pico de 261 nm para 265 nm, que corresponde ao comprimento de onda de máxima absorção de resíduos aromáticos (DAMODARAN, 2017). Neste caso, essa mudança pode estar atribuída à FSF e seus hidrolisados apresentarem perfis de aminoácidos distintos.

FIGURA 11 – RESULTADOS DAS ANÁLISES ESPECTROMÉTRICAS DE AMOSTRAS DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO (FSF) E DE SEUS HIDROLISADOS (HFSF)



Os gráficos apresentam: (a) espectros de absorção no UV, (b) espectros de dicroísmo circular no UV distante, (c) perfis de absorbância obtidos por DRIFTS e (d) a derivada dos perfis de DRIFTS.

Os espectros de DC (FIGURA 11B) demonstram que a proteína da FSF já se encontra desnaturada, pois o sinal negativo na faixa de 220 a 230 nm é mais fraco que o pico abaixo de 200 nm, que corresponde à presença de estruturas aleatórias (BRAHMS; BRAHMS, 1980; CAMPBELL; DWEK, 1984). Já para as amostras de HFSF, o pico abaixo de 200 nm é visivelmente mais intenso em relação ao sinal em comprimentos de onda maiores, o que pode estar ligado a um grau de desnaturação superior em relação à FSF, corroborando com os resultados dos espectros UV. Para reforçar essa constatação, os dados de DC foram avaliados pelo método CONTINLL usando o *software* CDPPro para estimar a composição de

estruturas secundárias das amostras de FSF e seus hidrolisados. Os resultados apresentados na TABELA 7 indicam que, de fato, a estrutura da FSF foi modificada pela reação enzimática. Apesar da composição helicoidal não apresentar um padrão, é possível ver que as estruturas tipo folha decrescem com o aumento da duração da hidrólise. Consequentemente, o número total de estruturas secundárias decresce durante a hidrólise, como esperado. Além disso, a composição de estruturas aleatórias é visivelmente maior nas amostras dos hidrolisados.

TABELA 7 – CONFORMAÇÃO ESTRUTURAL DA FARINHA DE SANGUE DE FRANGO (FSF) E DE SEUS HIDROLISADOS (HFSF) A PARTIR DE DADOS DE DICROÍSMO CIRCULAR (DC)

Amostra	FSF	HFSF60	HFSF90	HFSF120
<i>Número de estruturas/100 resíduos</i>				
Hélices	1,251	1,489	1,335	1,393
Folhas	7,102	6,733	6,583	6,300
Total de estruturas secundárias	8,353	8,222	7,918	7,693
<i>Composições estruturais</i>				
Hélices	5,3%	6,0%	5,4%	6,2%
Folhas	41,8%	36,9%	35,5%	34,8%
Curvas	22,3%	22,5%	23,0%	23,0%
Aleatórias	30,6%	34,6%	36,1%	36,0%

Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica emergente no estudo de mudanças na estrutura química de proteínas e peptídeos durante a hidrólise (WANG et al., 2013). Os perfis de absorbância dos pós de FSF e HFSF obtidos por DRIFTS (FIGURA 11C) demonstraram que a estrutura química dos hidrolisados é visivelmente diferente que aquela observada para a FSF não hidrolisada. Os perfis se caracterizam principalmente pela banda de Amida I, associada principalmente a vibrações devido ao estiramento das ligações de C=O (ARRONDO *et al.*, 1993) com o máximo pico de absorção ocorrendo a 1670 cm^{-1} . FSF e HFSF apresentaram picos de absorção a 2974 cm^{-1} e a 3292 cm^{-1} , respectivamente relacionados com vibrações devido ao estiramento das ligações dos grupos alquil e amina, com a diferença de que a FSF também exibiu bandas consecutivas que se estendem até aproximadamente 3600 cm^{-1} , que corresponde a vibrações devido ao estiramento da ligação de grupos OH (CHEN *et al.*, 2014).

Na região da cadeia principal (*backbone*) da proteína ($1800\text{ a }800\text{ cm}^{-1}$), diferenças evidentes entre os perfis da FSF e de seus hidrolisados podem ser observadas. O pico a 1596 cm^{-1} no perfil da FSF relacionado às vibrações do

estiramento assimétrico do grupo COO^- se combina nos perfis das amostras de HFSF com o complexo sinal convoluto correspondente às estruturas relacionadas às bandas Amida I e o pico a 1408 cm^{-1} , que corresponde às vibrações do estiramento simétrico do grupo COO^- . Este é visivelmente mais intenso para as amostras de hidrolisados (WANG *et al.*, 2013; WUBSHET *et al.*, 2017). Além disso, o pico a 1238 cm^{-1} é observado em todos os quatro perfis e está relacionado à presença de ácidos nucleicos (KOSE; ONCEL, 2015), que pode ser possivelmente explicado como sendo traços de hemácias e glóbulos brancos do sangue de frango.

A segunda derivada dos espectros na região da cadeia principal dos perfis da FSF e de seus hidrolisados (FIGURA 11D) mostra claramente que os picos de absorção referentes a bandas características intensificam em função da duração da hidrólise. Particularmente, as bandas correspondentes ao estiramento simétrico dos grupos COO^- e vibrações em modo tesoura de grupos $-\text{NH}_3^+$ ($\sim 1520\text{ cm}^{-1}$) se destacam nesse aspecto. Essas observações vão de encontro ao que BÖCKER e colaboradores (2017) demonstraram, indicando que FTIR pode ser uma ferramenta adequada para monitorar a formação de terminais N e C durante a hidrólise.

4.6 PROPRIEDADES FUNCIONAIS

A capacidade de retenção de óleo (**CRO**) da FSF foi de $1,02 \pm 0,03\text{ mL/g}$. Para os hidrolisados, $2,55 \pm 0,11\text{ mL/g}$, $2,09 \pm 0,02\text{ mL/g}$ e $1,26 \pm 0,13\text{ mL/g}$ (HFSF60, HFSF90 e HFSF120, respectivamente). Neste estudo, os hidrolisados exibiram melhor habilidade em reter óleo de girassol do que a farinha de sangue. Essa melhoria está possivelmente relacionada a uma maior exposição de grupos hidrofóbicos resultante da proteólise (CHABANON *et al.*, 2007; MUNE, 2015). Melhorias na CRO também foram observadas em proteína isolada da colza hidrolisada por Alcalase® (Chabanon *et al.*, 2007), proteína do feijão de corda hidrolisada por Pepsina (Mune, 2015), e hidrolisado de proteína tipo gelatina de vieira quando a enzima Neutrase foi usada (Jin *et al.*, 2012). No entanto, a CRO dos hidrolisados caiu pela metade quando o GH foi aumentado de 22,6 para 29,7%. De acordo com ZAYAS (1997), KINSELLA e MELACHOURIS (1976), a retenção de óleos e gorduras de proteínas é um fenômeno envolvendo o aprisionamento físico de lipídios e depende do perfil de aminoácidos das proteínas, especialmente a fração de resíduos hidrofóbicos que interagem com as cadeias alifáticas das

moléculas de lipídios. Assim, uma possível explicação é que a hidrólise estendida produz menos grupos hidrofóbicos por unidade de peptídeo, reduzindo a habilidade dos hidrolisados em reter óleo. GBOGOURI e colaboradores (2004) verificaram resultados semelhantes em hidrolisados de subprodutos de salmão e observaram que um aumento do GH de 11,5 para 17,3% reduziu sua CRO em 21%. Ainda assim, a **CRO** das amostras de HFSF foi maior do que em relação a isolados de proteínas globulares (1,04 a 1,44 mL óleo de soja/g proteína) e isolado de proteína do tipo albumina (0,93 a 1,02 mL óleo de soja/g proteína) (CHABANON *et al.*, 2007), e teve valores similares a hidrolisados de subprodutos de salmão (2,80 a 3,55 mL óleo de milho/g proteína) (GBOGOURI *et al.*, 2004), hidrolisados da globulina 11S do girassol (2,4 a 2,8 mL óleo de soja/g proteína) (REN *et al.*, 2015) e proteína isolada de soja (2,29 a 2,51 mL óleo/g proteína) (LIADAKIS *et al.*, 1998).

A capacidade de espuma (**CE**) e a estabilidade da espuma (**EE**) das amostras de HFSF foram comparadas com as propriedades da PIS e estão apresentadas na FIGURA 12 (A e B, respectivamente). Diferenças significativas foram encontradas na **CE** para as diferentes durações de hidrólise, pH e interações amostra-pH ($p < 0,05$). Em geral, a **CE** dos hidrolisados aumentou significativamente com a extensão da hidrólise; o hidrolisado obtido após 120 min de hidrólise (HFSF120) apresentou maiores **CE** em pH neutro e alcalino (170,8 a 177,1%), enquanto o hidrolisado com duração mais curta (HFSF60) apresentou a menor **CE** (41,7 a 66,7%) dentre as amostras. Este resultado pode estar atribuído à redução da MM dos hidrolisados, como foi verificada na SDS-Tricina-PAGE, que melhorou a migração (peptídeos pequenos se difundem mais rapidamente) e a adsorção dos peptídeos à interface ar/água, pois mais grupos hidrofóbicos ficam expostos devido à hidrólise. Apesar dessas características serem melhoradas pela hidrólise extensiva, o que é desejável para agentes de espuma, elas não necessariamente resultam em espumas estáveis (PHILLIPS; WHITEHEAD; KINSELLA, 1994). Para ser caracterizado como um bom agente espumante, além de ser capaz de migrar rapidamente para a interface ar/água, precisa ser também bom surfatante para reduzir a tensão superficial durante o estágio transiente da formação da espuma (CHALAMAIAH *et al.*, 2015; PHILLIPS; WHITEHEAD; KINSELLA, 1994). A habilidade da boa formação de espumas a partir de soluções de proteína hidrolisada foi investigada por outros autores (CHALAMAIAH *et al.*, 2015; HALL *et al.*, 2017;

LICEAGA-GESUALDO; LI-CHAN, 1999; VAN DER VEN *et al.*, 2002), que também verificaram que a **CE** está positivamente correlacionada com o GH.

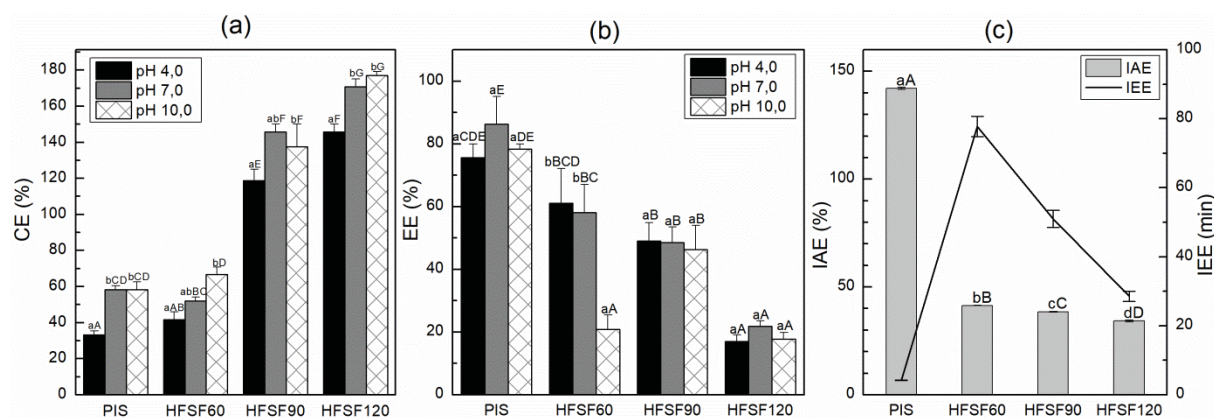
O pH influenciou a capacidade de espuma dos hidrolisados. O teste de Duncan revelou que a **CE** tende a diminuir em pH ácido e atinge um valor máximo em pH neutro ou alcalino, onde diferenças significativas não foram observadas a nível de significância de 5% (exceto para a amostra HFSF60). Portanto, quando a carga líquida é aumentada, as propriedades de espuma são melhoradas. De acordo com KLOMPONG e colaboradores (2007), alterações na carga líquida de proteínas estão ligadas a mudanças na capacidade adsortiva da proteína na interface ar/água. Espumas de soluções de HFSF foram acompanhadas por 60 min para verificar a influência do pH e do tempo de hidrólise na sua estabilidade. Como mostra a FIGURA 12B, a **EE** dos HFSF diminuiu com o GH. A **EE** dos hidrolisados foi maior para os grupos correspondentes a 60e 90 min de hidrólise e foi favorecida em meio ácido ou básico. Apesar de HFSF120 exibir excelente espumabilidade, a espuma não foi capaz de se manter estável por muito tempo. A diminuição da **EE** em pH alcalino pode estar atribuída à repulsão iônica dos peptídeos (KLOMPONG *et al.*, 2007).

Outras observações na literatura indicam que a hidrólise de proteínas pode melhorar suas propriedades de espuma (capacidade e estabilidade) dependendo da natureza dos peptídeos e da extensão da hidrólise. CHABANON e colaboradores (2007) verificaram que a CE de hidrolisados de proteína isolada da colza foi favorecida até apenas um GH de 5% e que valores acima disso não exerceram influência significativa na EE. Eles atribuíram esse resultado ao fato de que a hidrólise extensiva produz peptídeos curtos, que são menos eficientes em reduzir a tensão superficial, o que está de acordo com os resultados para os HFSF.

As propriedades de espuma dos hidrolisados foram comparadas às da PIS, uma proteína comercial cujas propriedades funcionais têm papéis importantes em muitos alimentos, como merengue, sorvete e nogados (ZENG *et al.*, 2013). Enquanto o aumento do GH e do pH (de 4 para 10) melhorou a **CE** das amostras de HFSF, comparada à PIS ($p < 0,05$), essa tendência não foi verificada para a **EE**. A amostra de HFSF60, porém, demonstrou perfis semelhantes à da PIS na capacidade de espuma: ambos os grupos exibiram as menores **CE** (variando de 33,3% a 66,7% de acordo com o pH) e boa estabilidade (até 86,3%). A espuma de PIS teve maior estabilidade do que as produzidas com os hidrolisados, com valores

variando de 75,6 a 86,3% em pH ácido e neutro. Os resultados são conclusivos no que diz respeito às boas características que alguns hidrolisados demonstraram: as amostras de HFSF90 e HFSF120 possuem **CE** similar ou maior do que a da PIS. Esses dados sugerem que, com o tratamento adequado, HFSF pode ser um interessante agente de espuma. Por outro lado, o aumento da duração da hidrólise promoveu a espumabilidade do HFSF. Este parâmetro teve influência negativa na estabilidade das espumas devido à perda de atividade superficial dos peptídeos menores. Portanto, o GH possui efeitos opostos nas propriedades de espuma de HFSF e a aplicabilidade desses hidrolisados requer atenção especial com relação à extensão da hidrólise. Dentre as amostras avaliadas, a de HFSF90 apresentou o melhor comportamento, portanto, um GH de aproximadamente 25% pode ser o ideal para se obter hidrolisados com as melhores propriedades de espuma.

FIGURA 12 – PROPRIEDADES DE ESPUMA E PROPRIEDADES EMULSIFICANTES DOS HIDROLISADOS DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO (FSF) E DA PROTEÍNA DE SOJA (PIS).



O teste de Duncan com significância de 5% foi usado para comparar os resultados de cada amostra: para (a) a capacidade de espuma (CE) e (b) a estabilidade da espuma (EE), as letras minúsculas classificam as espumas pelo efeito do pH dentro de cada grupo de amostras e as letras maiúsculas classificam as espumas de todos os grupos de amostras; para (c) as propriedades emulsificantes, as letras minúsculas classificam as emulsões de acordo com o índice de atividade emulsificante (IAE) e as letras maiúsculas, de acordo com o índice de estabilidade da emulsão (IEE). Todas as medidas estão apresentadas como média \pm erro padrão de uma triplicata ($n = 3$).

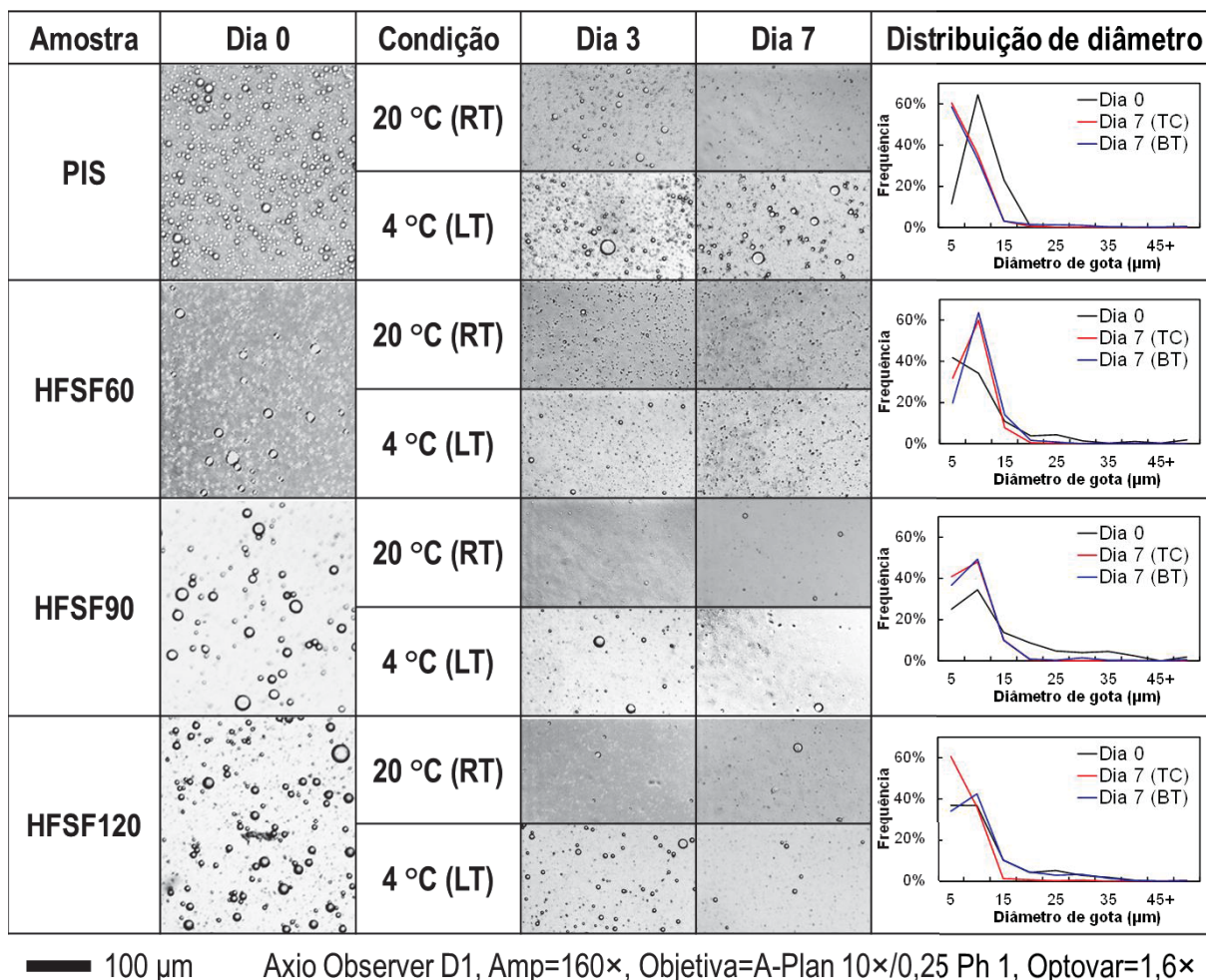
Com o objetivo de avaliar o potencial da HFSF como um agente emulsificante, sua atividade emulsificante (**IAE**) e estabilidade (**IEE**) obtidas pelo método turbidimétrico foram determinadas e comparadas às da PIS, um emulsificante proteico comercial, como mostra a FIGURA 12C. Todas as emulsões tiveram **IAE** e **IEE** significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Duncan. A primeira observação é que a PIS tem uma atividade muito superior (142,1 m^2/g) comparada à dos hidrolisados (34,2 a 41,4 m^2/g), mas estabilidade muito baixa (4,2 min contra 28,6 a 77,7 min dos hidrolisados). Este comportamento é

esperado para proteínas globulares como a PIS, pois, durante a formação da emulsão, ela se desenrola na superfície da gota, aumentando sua hidrofobicidade enquanto mais grupos hidrofóbicos são expostos, fortalecendo a camada em volta das gotas de óleo. No entanto, a presença de íons intensifica a hidrofobicidade da proteína, favorecendo interações hidrofóbicas proteína-proteína, levando à agregação das gotas na emulsão de PIS e, por consequência, sua desestabilização (MCCLEMENTS; BAI; CHUNG, 2017). Além disso, a alta atividade emulsificante está ligada a emulsões com alta área interfacial, o que também contribui para uma menor estabilidade. Para os hidrolisados, apesar de suas emulsões serem estatisticamente diferentes uma da outra, elas tiveram uma faixa estreita de **IAE** e alta **IEE** comparadas à emulsão de PIS, com valores que diminuíram de acordo com a duração da hidrólise. Neste caso, esses resultados podem ser explicados pela baixa MM dos peptídeos presentes nos hidrolisados e uma possível proporção desbalanceada de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos devido aos produtos formados durante a clivagem das ligações peptídicas. Apesar de alguns autores relatarem melhores propriedades emulsificantes em GH superiores (CHALAMAIAH *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2012), a atividade emulsificante e a estabilidade da emulsão são geralmente positivamente correlacionadas com o tamanho da cadeia peptídica, isto é, a hidrólise extensiva resulta na perda das propriedades emulsificantes com a produção de peptídeos mais curtos (GBOGOURI *et al.*, 2004).

As emulsões foram analisadas em microscópio ótico e o comportamento da sua estabilidade foi acompanhado ao longo de uma semana, comparando o efeito da temperatura de conservação (4 °C e 20 °C). Micrografias das emulsões recém-preparadas (dia 0) e as amostras de emulsões armazenadas nas diferentes condições de temperatura (dia 3 e 7), incluindo a distribuição de diâmetro de gotas (DDG) inicial e final estão apresentadas na FIGURA 13. As imagens das emulsões recém-preparadas estão de acordo com os resultados da **IAE**: a emulsão de PIS possui uma população de gotas muito maior que as emulsões de HFSF, resultando em uma atividade emulsificante muito superior à destas; para estas emulsões, o efeito da duração da hidrólise não pode ser verificado nessas imagens à primeira vista, como esperado, já que o intervalo de valores de **IAE** encontrados é pequeno. Quanto à estabilidade das emulsões, os resultados são, novamente, consistentes com aqueles obtidos por turbidimetria e o comportamento das emulsões é similar entre todas as amostras analisadas. Durante a passagem dos dias, a população de

gotas na área observável das micrografias diminui, especialmente para as amostras da emulsão de PIS. Ainda, as micrografias mostram claramente que as amostras armazenadas em baixa temperatura (BT) exibiram maior estabilidade do que aquelas armazenadas em temperatura controlada (TC). Todas as emulsões tiveram DDG monomodais concentradas nos intervalos de 0 a 5 μm ou de 5 a 10 μm . Após 7 dias de armazenamento, todas as DDG se tornaram mais concentradas nos intervalos de menor diâmetro de gota porque as forças de atração devido a interações de van der Waals e as interações hidrofóbicas são menos pronunciadas em gotas de diâmetro inferior (MCCLEMENTS, 2015), enquanto gotas maiores estão mais suscetíveis à agregação, resultando na sua quebra, seja por separação gravitacional, floculação ou coalescência (TADROS, 2013). Isso é mais evidente para as amostras armazenadas a 20 °C, pois a DDG final dessas amostras encontra-se ainda mais concentrada em torno dos menores diâmetros comparadas às amostras armazenadas em baixa temperatura. Nessa condição, a mobilidade das gotas é reduzida e sua estabilidade é aumentada (ZÜGE *et al.*, 2013). Além disso, após 7 dias, a frequência dos intervalos de 5 a 10 μm diminui com a duração da hidrólise, apresentando a mesma tendência que foi observada para os resultados de *IEE*, indicando que o emulsificante com maior *IEE* é capaz de manter gotas de diâmetros maiores. Essas observações mostram que o GH limita o desempenho de HFSF como agente emulsificante como resultado do aumento da solubilidade dos peptídeos (ligado à redução da MM com o aumento da duração da hidrólise) e um possível decréscimo da quantidade de produtos surfactantes gerados durante a hidrólise, o que também foi observado por CHEN e colaboradores (2018) em hidrolisados de proteína isolada do amendoim.

FIGURA 13 – MICROGRAFIAS SELECIONADAS (AMPLIAÇÃO DE 160×) E DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO DE GOTAS (DDG) DE EMULSÕES O/A PREPARADAS COM HIDROLISADOS DE FARINHA DE SANGUE DE FRANGO (HFSF) E PROTEÍNA DE SOJA (PIS).



Os resultados das análises das propriedades de espuma e emulsificantes demonstram que os HFSF possuem propriedades funcionais melhoradas. SORAPUKDEE e NARUNATSOPANON (2017) estudaram as propriedades funcionais do sangue de frango e, exceto pelo *IEE*, todos os valores encontrados foram inferiores tanto para as propriedades de espuma (capacidade de 110 a 130% e estabilidade de 5 a 25%) como para as propriedades emulsificantes (atividade de 7 a 30 m²/g e estabilidade de 130 a 300 min).

4.7 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES

O efeito do tempo da hidrólise sobre as propriedades antioxidantes dos HFSF foi avaliado mediante três diferentes métodos relacionados principalmente ao mecanismo de transferência de elétrons: FRAP, ABTS e DPPH. Além das medidas apresentadas em equivalentes de Trolox, os coeficientes de correlação de Pearson foram calculados para o tempo de hidrólise, o GH e a concentração de heme liberada durante a hidrólise, como mostra a TABELA 8.

TABELA 8 – POTENCIAIS ANTIOXIDANTES DOS HIDROLISADOS E COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE PEARSON COM VARIÁVEIS DE PROCESSO.

Amostra	FRAP ($\mu\text{mol TE/g}$)	ABTS ($\mu\text{mol TE/g}$)	DPPH ($\mu\text{mol TE/g}$)
HFSF60	$6,18 \pm 0,04^a$	$33,04 \pm 0,10^c$	$84,02 \pm 0,04^c$
HFSF90	$3,24 \pm 0,01^b$	$58,40 \pm 0,25^a$	$85,99 \pm 0,02^a$
HFSF120	$2,26 \pm 0,01^c$	$52,18 \pm 0,36^b$	$84,61 \pm 0,10^b$
<i>Coeficientes de correlação de Pearson</i>			
Tempo de hidrólise	-0,960	0,724	0,290
Grau de hidrólise	-0,855	0,521	0,033
Heme	-0,938	0,674	0,222

Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão de uma triplicata ($n = 3$) em equivalentes de Trolox (TE) por grama de amostra. Letras minúsculas sobrescritas indicam grupos de amostras para cada ensaio classificados de acordo com o teste de Duncan ($p < 0,05$) e em ordem decrescente.

Os resultados apresentam diferentes comportamentos dos hidrolisados de acordo com cada análise. Os resultados de FRAP indicam que a extensão da hidrólise piora a atividade antioxidante dos hidrolisados. Os de ABTS indicam que a hidrólise de 90 min resulta em um aumento de 76,8% do potencial antioxidante do hidrolisado em relação àquele obtido após 60 min de hidrólise. Quanto aos resultados de DPPH, apesar de significativa ($p < 0,05$), a diferença de potencial antioxidante entre as amostras analisadas é pequena ($< 2,5\%$).

Os coeficientes de correlação de Pearson calculados auxiliam a elucidar o impacto do processo sobre os potenciais antioxidantes. Avaliando o tempo de hidrólise, GH e heme liberada durante o processo, o FRAP teve maior ligação com essas variáveis, apresentando correlação intensamente negativa com o tempo de hidrólise e a concentração de heme. Isso sugere que a presença do pigmento pode trazer impactos negativos no papel dos HFSF como redutores, prejudicando a capacidade desses hidrolisados de mitigar o efeito catalítico de metais em processos oxidativos, como o ferro. Outra possível causa pode estar relacionada à enzima

empregada; BAH e colaboradores (2016b) observaram valores de FRAP crescentes em hidrolisados da fração celular de sangue de diferentes animais com a extensão da hidrólise usando enzimas fúngicas. CHANG, WU e CHIANG (2007) verificaram que o poder redutor de hidrolisados de hemoglobina de porco teve um pequeno decréscimo com o tempo de hidrólise com Alcalase®, enquanto seu valor aumentou com o tempo de hidrólise com Flavourzyme®. Ainda, ÁLVAREZ e colaboradores (2016) sugerem que uma proporção elevada de aminoácidos em relação a peptídeos também influencia de forma negativa na habilidade quelante do íon Fe(II).

Quanto à capacidade de sequestro dos radicais ABTS e DPPH, apesar de positivamente correlacionada com as três variáveis de processo analisadas, não é possível fazer observações conclusivas acerca da extensão da hidrólise. De modo geral, o sequestro de radicais é melhorado estendendo-se a hidrólise até certo ponto, possivelmente porque essa habilidade é inicialmente melhorada com a produção de peptídeos menores, mas efeitos secundários não percebidos resultam na diminuição dessa propriedade. Além disso, a pequena variação do poder de sequestro de DPPH também foi observada para outros hidrolisados de proteínas de sangue animal (BAH *et al.*, 2016b; CHANG; WU; CHIANG, 2007).

Apesar das tentativas de estudar a atividade antioxidante de peptídeos, seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado. Contudo, além de atuarem como inibidores da peroxidação de lipídios, sequestradores de radicais livres e quelantes de íons de metais de transição, foi verificado que peptídeos antioxidantes protegem células da ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) mediante indução de genes (SARMADI; ISMAIL, 2010; SINGH; VIJ; HATI, 2014). As propriedades antioxidantes de peptídeos estão principalmente relacionadas à sua composição, estrutura e hidrofobicidade (SARMADI; ISMAIL, 2010). Aminoácidos aromáticos como Trp, Tyr e Phe possuem, respectivamente, grupos fenólicos, indólicos e imidazólicos, conferindo-lhes a habilidade de capturar radicais. Tyr, Trp, Met, Lys e Cys são conhecidos por sua habilidade de reduzir o íon Fe(III) a Fe(II) e quelar íons Fe(II) e Cu(II) e o aminoácido básico His está relacionado à captura de radicais. Não apenas a presença de determinados aminoácidos, mas como estão sequenciados nos peptídeos também é um fator importante para sua atividade antioxidante (DE CASTRO; SATO, 2015).

Os resultados obtidos indicam que a hidrólise enzimática de FSF conseguiu a produção de peptídeos antioxidantes. O entendimento do efeito das condições de

processo sobre a atividade antioxidante desses hidrolisados requer a investigação de outras características de seus peptídeos quanto à sua composição de aminoácidos, as sequências presentes e sua hidrofobicidade. Com as observações encontradas, no entanto, já foi possível constatar que, nas condições utilizadas, o hidrolisado obtido após 90 min de hidrólise apresenta as melhores características entre as amostras avaliadas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho permitiu conhecer importantes aspectos acerca da produção e das propriedades físico-químicas, funcionais e antioxidantes de hidrolisados proteicos de farinha de sangue de frango.

A análise da composição química da FSF mostrou que ela é um material riquíssimo em proteína (93,42 g/100g) e com alto teor de ferro (1.290,28 mg/kg) além de conteúdos elevados de outros minerais importantes, como o magnésio (230,32 mg/kg) e o zinco (38,58 mg/kg). Isso indica que esse produto tem potencial como fonte de compostos de interesse para a indústria de alimentos.

O planejamento experimental foi uma ferramenta útil para o estudo da hidrólise enzimática de FSF, permitindo observar que a concentração de enzima e a interação entre a temperatura e o pH da reação são as variáveis mais importantes para se alcançar o GH desejado. A eletroforese em gel mostrou que os hidrolisados obtidos com 60 a 120 min de reação são majoritariamente compostos por peptídeos menores que 14,4 kDa.

Através da análise de cor dos hidrolisados em pó, observou-se que os parâmetros medidos podem ser usados como método indireto de determinação da quantidade de heme liberada durante a hidrólise. Foi observado com a microscopia eletrônica de varredura que esses hidrolisados em pó são bastante higroscópicos e que formam agregados de tamanho decrescente e com formas mais definidas à medida que o GH aumenta. Além disso, a análise termogravimétrica demonstrou que a hidrólise conferiu maior estabilidade térmica aos hidrolisados comparados à FSF.

Alterações conformacionais e na estrutura química de proteínas de FSF ocorreram durante a hidrólise; espectroscopia de absorção no UV, dicróismo circular e espectrometria no infravermelho demonstraram que a FSF já se encontrava altamente desnaturada. Esta sofreu mais perda de estruturas secundárias durante a hidrólise enzimática, além de ter sido confirmado que a clivagem de ligações peptídicas pode ser verificada por essas técnicas.

Quanto às propriedades funcionais, as amostras de HFSF apresentaram capacidades de retenção de óleo melhores do que a da FSF, mas que diminuem com a extensão da hidrólise. As propriedades emulsificantes e de espuma das amostras de HFSF foram comparadas com as da PIS. Espumas de HFSF

apresentaram melhor comportamento em pH neutro, pois tiveram espumabilidade crescente com o GH e estabilidade maior, mas que diminui com a extensão da hidrólise, sendo que o hidrolisado obtido com 90 min de reação apresentou a melhor combinação de propriedades de espuma. Enquanto isso, a atividade emulsificante dos hidrolisados foi muito inferior à da PIS, porém a estabilidade das emulsões foi expressivamente maior e decrescente com o GH. As emulsões foram observadas no microscópio ótico a fim de melhor entender sua estabilidade, permitindo-se verificar que as melhores propriedades emulsificantes dentre os hidrolisados são encontradas para o GH mais baixo. Independente da temperatura de armazenamento, a emulsão preparada com o HFSF de 60 min de hidrólise conseguiu manter estáveis gotas de maior diâmetro por 7 dias.

A atividade antioxidante dos hidrolisados foi investigada mediante os métodos FRAP, ABTS e DPPH, cujos resultados foram correlacionados com variáveis de processo. Foi possível observar que a atividade FRAP foi prejudicada com a extensão da hidrólise, indicando que um GH elevado resulta em peptídeos menos capazes de reduzir metais que podem catalisar processos oxidativos. A capacidade de sequestro do radical ABTS aumentou expressivamente da amostra de HFSF de 60 min para 90 min de hidrólise, onde foi encontrado o valor máximo dessa atividade. O hidrolisado obtido com 90 min de reação também apresentou a máxima capacidade de sequestro do radical DPPH, apesar dos valores para as outras amostras terem ficado próximos. Um melhor entendimento dos fatores que levaram a esses resultados requer um aprofundamento na caracterização dos peptídeos dos hidrolisados, envolvendo a determinação da sua composição e sequenciamento de aminoácidos, além da quantificação de sua hidrofobicidade.

5.1 CONCLUSÃO

Os resultados e discussões apresentados neste trabalho foram capazes de atingir os objetivos propostos. Foi demonstrado que a extensão da hidrólise da FSF está profundamente relacionada com as propriedades resultantes dos hidrolisados, mas que fatores secundários também podem interferir. Além disso, análises espectrométricas, da morfologia e da cor dos produtos também são úteis para avaliar o efeito do processo em suas propriedades. Assim, são ferramentas úteis para o controle de qualidade. Limitando a hidrólise a um valor mais baixo de GH,

obtém-se um HFSF com melhor capacidade de retenção de óleo e propriedades emulsificantes, enquanto graus de hidrólise mais elevados resultam em uma maior liberação de heme e em peptídeos de menor tamanho. Já um GH com valor intermediário é indicado para a obtenção de um hidrolisado com boas propriedades espumantes e antioxidantes. Portanto, a hidrólise em condições controladas com rigor quanto ao seu grau é imperativa para a obtenção de hidrolisados com propriedades adequadas para a aplicação desejada.

5.2 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- **Processo de ultrafiltração:** os processos de separação por membrana são amplamente utilizados em biopeptídeos, destacando-se a ultra e a nanofiltração. Uma vez que hidrolisados enzimáticos de proteína compreendem peptídeos com larga distribuição de tamanhos e massas moleculares, a separação destes em faixas mais homogêneas permite estudar suas propriedades com menos interferências e verificar a melhoria de suas propriedades.
- **Incorporação em biofilmes:** mesmo que os peptídeos dos hidrolisados não possuam as propriedades requeridas para a formação de filmes, podem ser usados como aditivos em biofilmes já conhecidos para lhes conferir propriedades especiais.
- **Propriedades antioxidantes e antimicrobianas:** a bioatividade dos hidrolisados de farinha de sangue merecem ser estudadas a fundo. É necessário fazer uma caracterização mais completa dos peptídeos, a fim de entender como ajustar o processo de forma que resulte em produtos com propriedades aperfeiçoadas, além de também se avaliar suas propriedades *in vivo*.
- **Estudo de emulsões:** o estudo das emulsões preparadas com hidrolisados de farinha de sangue pode ser bastante expandido. Algumas possibilidades incluem (a) a estabilidade oxidativa de emulsões, (b) as propriedades surfactantes dos hidrolisados, (c) a interação dos hidrolisados com outros ingredientes que podem estar presentes em emulsões de alimentos e (d) a determinação do mecanismo predominante de desestabilização de emulsões com hidrolisados de farinha de sangue de frango.

REFERÊNCIAS

- ADJE, E. Y. et al. Controlled Enzymatic Hydrolysis: A New Strategy for the Discovery of Antimicrobial Peptides. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 5, n. 3, p. 176–186, 2013.
- ADLER-NISSEN, J. Enzymatic hydrolysis of fish proteins. **Process Biochemistry**, v. 12, n. 6, p. 18–23, 1977.
- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic Hydrolysis of Food Proteins**. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
- ÁLVAREZ, C. et al. Use of response surface methodology to describe the effect of time and temperature on the production of decoloured, antioxidant and functional peptides from porcine haemoglobin by sub-critical water hydrolysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 280–289, 2016.
- ÁLVAREZ, C.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Production of porcine hemoglobin peptides at moderate temperature and medium pressure under a nitrogen stream. Functional and antioxidant properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 22, p. 5636–5643, 2012.
- ANDRIGUETTO, J. M. et al. **Nutrição animal: bases e fundamentos da nutrição animal**. São Paulo: Nobel, 2002.
- ARRONDO, J. L. et al. Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 59, n. 1, p. 23–56, 1993.
- ARVANITOYANNIS, I. S.; LADAS, D. Meat waste treatment methods and potential uses. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 3, p. 543–559, 2008.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). **Perfil da Pecuária no Brasil - Relatório Anual 2018**. São Paulo: [s.n.].
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Relatório Anual 2018**. São Paulo: [s.n.].
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **AOAC Official Methods of Analysis**. 15th. ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, Inc., 1990. v. 1
- BAH, C. S. F. et al. Generation of bioactive peptide hydrolysates from cattle plasma using plant and fungal proteases. **Food Chemistry**, v. 213, p. 98–107, 2016a.
- BAH, C. S. F. et al. Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep, pig and cattle red blood cell fractions using plant and fungal protease preparations. **Food Chemistry**, v. 202, p. 458–466, 2016b.

BARBI, R. C. T. et al. Eriobotrya japonica seed as a new source of starch: Assessment of phenolic compounds, antioxidant activity, thermal, rheological and morphological properties. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 646–658, 2018.

BARR, I.; GUO, F. Pyridine Hemochromagen Assay for Determining the Concentration of Heme in Purified Protein Solutions. **BIO-PROTOCOL**, v. 5, n. 18, p. 395–401, 2015.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BERRY, E. A.; TRUMPOWER, B. L. Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra. **Analytical Biochemistry**, v. 161, n. 1, p. 1–15, 1987.

BHAT, Z. F.; KUMAR, S.; BHAT, H. F. Bioactive peptides of animal origin: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5377–5392, 2015.

BÖCKER, U. et al. Fourier-transform infrared spectroscopy for characterization of protein chain reductions in enzymatic reactions. **The Analyst**, v. 142, n. 15, p. 2812–2818, 2017.

BRAHMS, S.; BRAHMS, J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. **Journal of Molecular Biology**, v. 138, n. 2, p. 149–178, abr. 1980.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BUSTILLO-LECOMPTE, C. F.; MEHRVAR, M. Slaughterhouse wastewater characteristics, treatment, and management in the meat processing industry: A review on trends and advances. **Journal of Environmental Management**, v. 161, p. 287–302, 2015.

CAMPBELL, I. D.; DWEK, R. A. **Biological Spectroscopy**. Wokingham: Addison-Wesley, 1984.

CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. Part I: The Conformation of Biological Molecules. In: **Biophysical Chemistry**. San Francisco: W. H. Freeman & Co., 1980.

CARPINÉ, D. et al. Development and Characterization of Soy Protein Isolate Emulsion-Based Edible Films with Added Coconut Oil for Olive Oil Packaging: Barrier, Mechanical, and Thermal Properties. 2015.

CHABANON, G. et al. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 1419–1428, out. 2007.

CHALAMAIAH, M. et al. Antioxidant activity and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) roe (egg). **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5817–5825, 2015.

CHANDRASEKARAN, M. **Valorization of Food Processing By-Products**. Boca Raton: CRC Press, 2013.

CHANG, C. Y.; WU, K. C.; CHIANG, S. H. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1537–1543, 2007.

CHEN, L. et al. Emulsification performance and interfacial properties of enzymically hydrolyzed peanut protein isolate pretreated by extrusion cooking. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 607–616, 2018.

CHEN, X. et al. Direct conversion of chitin into a N-containing furan derivative. **Green Chemistry**, v. 16, n. 4, p. 2204–2212, 2014.

CHENG, F.-Y. et al. The in vitro antioxidant properties of alcalase hydrolysate prepared from silkie fowl (*Gallus gallus*) blood protein. **Animal Science Journal**, v. 87, n. 7, p. 921–928, 2016.

CHEUNG, L. K. Y. et al. Effects of exopeptidase treatment on antihypertensive activity and taste attributes of enzymatic whey protein hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v. 13, p. 262–275, 2015.

CHURCH, F. C. et al. Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 6, p. 1219–1227, 1983.

CIAN, R. E.; DRAGO, S. R.; GONZÁLEZ, R. J. Influence of pH on colour and iron content of peptide fractions obtained from bovine Hb concentrate hydrolysates. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 7, p. 1348–1353, 2012.

COFFMANN, C. W.; GARCIA, V. V. Functional properties and amino acid content of a protein isolate from mung bean flour. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 12, n. 5, p. 473–484, 1977.

CONDE, J. M.; RODRÍGUEZ PATINO, J. M. The effect of enzymatic treatment of a sunflower protein isolate on the rate of adsorption at the air-water interface. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 1001–1009, 2007.

CONSELHO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE - CEMA. **Resolução CEMA 070/09 - Anexo 7**, 2009.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. **Resolução CONAMA 430/11**, 2011.

DAMODARAN, S. Amino acids, peptides and proteins. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. (Eds.). **Fennema's food chemistry**. Fifth edit ed. Boca Raton: CRC Press, 2017. p. 235–356.

DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. **Food Research International**, v. 74, p. 185–198, 2015.

DOEHLERT, D. H. Uniform Shell Designs. **Applied Statistics**, v. 19, n. 3, p. 231, 1970.

EMBRAPA. **Estatísticas - Brasil - Frangos de corte**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/frangos/brasil>>. Acesso em: 23 jul. 2018.

FILHO, J. I. DOS S. et al. Os 35 anos que mudaram a avicultura brasileira. In: SOUZA, J. C. P. V. B. et al. (Eds.). . **Sonho, desafio e tecnologia: 35 anos de construção da Embrapa Suínos e Aves**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2011. p. 59–84.

FOEGEDING, E. A.; DAVIS, J. P. Food protein functionality: A comprehensive approach. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1853–1864, 2011.

GBOGOURI, G. A. et al. Influence of Hydrolysis Degree on the Functional Properties of Salmon Byproducts Hydrolysates. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 8, p. C615–C622, 2004.

GÓMEZ, L. J.; ZAPATA, J. E. Effects of Hydrolysis and Digestion in Vitro on the Activity of Bovine Plasma Hydrolysates as Inhibitors of the Angiotensin I Converting Enzyme. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 3, p. 386–393, 2014.

GRAYCAR, T. P. et al. Subtilisins. **Handbook of Proteolytic Enzymes**, v. 3, n. 1999, p. 3148–3155, 2013.

GUPTA, R.; BEG, Q.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15–32, 2002.

HALL, F. G. et al. Functional properties of tropical banded cricket (*Gryllodes sigillatus*) protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 224, p. 414–422, 2017.

HAYES, M. et al. Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptide functions. **Biotechnology Journal**, v. 2, n. 4, p. 435–449, 2007.

HEDSTROM, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501–4524, dez. 2002.

HOOPER, N. M. Proteases: a primer. **Essays in biochemistry**, v. 38, p. 1–8, 2002.

HUANG, S.; LIU, P. Inhibition of Angiotensin I - Converting Enzymes by Enzymatic Hydrolysates from Chicken Blood. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 18, n. 6, p. 458–463, 2010.

HUMISKI, L. M.; ALUKO, R. E. Physicochemical and bitterness properties of enzymatic pea protein hydrolysates. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 8, 2007.

IN, M. J.; JEONG CHAE, H.; OH, N. S. Process development for heme-enriched peptide by enzymatic hydrolysis of hemoglobin. **Bioresource Technology**, v. 84, n. 1, p. 63–68, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005.

JACOBSEN, C. F. et al. The pH-stat and its use in biochemistry. **Methods of biochemical analysis**, v. 4, p. 171–210, 1957.

JAHANBANI, R. et al. Kinetics Study of Protein Hydrolysis and Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme by Peptides Hydrolysate Extracted from Walnut. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 24, n. 1, p. 77–85, 2018.

JAIN, S.; DHAKAL, D.; ANAL, A. K. Bioprocessing of Chicken Meat and Egg Processing Industries' Waste to Value-Added Proteins and Peptides. In: ANAL, A. K. (Ed.). **Food Processing By-Products and their Utilization**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2017. p. 367–394.

JAYATHILAKAN, K. et al. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: A review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 278–293, 2012.

JOINT WHO/FAO/UNU EXPERT CONSULTATION. Protein and amino acid requirements in human nutrition. **World Health Organization technical report series**, n. 935, p. 1–265, back cover, 2007.

KASPCHAK, E. et al. Determination of heat-set gelation capacity of a quinoa protein isolate (*Chenopodium quinoa*) by dynamic oscillatory rheological analysis. **Food Chemistry**, v. 232, p. 263–271, out. 2017.

KINSELLA, J. E.; MELACHOURIS, N. Functional properties of proteins in foods: A survey. **C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 219–280, 1976.

KLOMPONG, V. et al. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1317–1327, 2007.

KOSE, A.; ONCEL, S. S. Properties of microalgal enzymatic protein hydrolysates: Biochemical composition, protein distribution and FTIR characteristics. **Biotechnology Reports**, 2015.

LACOU, L.; LÉONIL, J.; GAGNAIRE, V. Functional properties of peptides: From single peptide solutions to a mixture of peptides in food products. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 187–199, 2016.

LAM, R. S. H.; NICKERSON, M. T. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 975–984, 2013.

LEMES, A. C. et al. A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, 2016.

LI, Q. et al. Commercial proteases: Present and future. **FEBS Letters**, v. 587, n. 8, p. 1155–1163, 2013.

LIADAKIS, G. N. et al. Isolation of tomato seed meal proteins with salt solutions. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 3, p. 450–453, 1998.

LICEAGA-GESUALDO, A. M.; LI-CHAN, E. C. Y. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 64, n. 6, p. 1000–1004, 1999.

LIU, B. Y. et al. Effect of sequential hydrolysis with endo- and exo-peptidase on bitterness properties of wheat gluten hydrolysates. **RSC Advances**, v. 6, n. 33, p. 27659–27668, 2016.

LIU, H.; LI, C.; SUN, X. S. Improved water resistance in undecylenic acid (UA)-modified soy protein isolate (SPI)-based adhesives. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 577–584, 2015.

MATIAS, C. F. DE Q. et al. Utilização de farinhas de origem animal na avicultura. **Nutritime**, v. 9, n. 5, p. 1944–1964, 2012.

MCCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2015.

MCCLEMENTS, D. J.; BAI, L.; CHUNG, C. Recent Advances in the Utilization of Natural Emulsifiers to Form and Stabilize Emulsions. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, n. 1, p. 205–236, 2017.

MELLANDER, O. The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. **Acta Societatis Medicorum Upsaliensis**, v. 55, n. 5–6, p. 247–55, dez. 1950.

MEROPS. **Structure for peptidase S08.001: subtilisin Carlsberg**. Disponível em: <<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/structure?mid=S08.001>>. Acesso em: 13 mar. 2017.

MIRABELLA, N.; CASTELLANI, V.; SALA, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 65, p. 28–41, 2014.

MÖLLER, N. P. et al. Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 4, p. 171–182, 2008.

MONSEN, E. R. Iron nutrition and absorption: dietary factors which impact iron bioavailability. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 88, n. 7, p. 786–90, jul. 1988.

MUNE, M. A. M. Influence of Degree of Hydrolysis on the Functional Properties of Cowpea Protein Hydrolysates. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 2386–2392, dez. 2015.

MYERS, D. **Surfactant Science and Technology**. 3rd ed ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2006.

NANDA, P. K. et al. Biodegradable polymers : PPPart VI. Biodegradable plastics of soy protein isolate modified with thiourea. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 89, n. 3, p. 935–940, 2007.

NEKLYUDOV, A. D.; IVANKIN, A. N.; BERDUTINA, A. V. Properties and uses of protein hydrolysates (review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 452–459, 2000.

NIELSEN, P. M.; PETERSEN, D.; DAMBMANN, C. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 5, p. 642–646, jun. 2001.

OCKERMAN, H. W.; HANSEN, C. L. **Animal By-Product Processing**. Chichester: Ellis Horwood Ltd., 1988.

PANYAM, D. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 4, p. 120–125, abr. 1996.

PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying Properties of Proteins—Evaluation of A Turbidimetric Technique. **J. Agric. Food Chem.**, v. 26, n. 3, p. 716, 1978.

PHILLIPS, L. G.; WHITEHEAD, D. M.; KINSELLA, J. **Structure–Function Properties of Food Proteins**. London: Academic Press, 1994.

PINTO, L. A. DE M. et al. Aspectos ambientais do abate de aves: uma revisão. **Revista UNINGÁ**, v. 22, n. 3, p. 44–50, 2015.

PISOSCHI, A. M.; NEGULESCU, G. P. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 01, n. 01, p. 1–10, 2012.

QU, W. et al. Structure and functional characteristics of rapeseed protein isolate-dextran conjugates. **Food Hydrocolloids**, v. 82, p. 329–337, 2018.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 58–69, 2016.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, maio 1999.

REN, J. et al. Modification of Structural and Functional Properties of Sunflower 11S Globulin Hydrolysates. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 33, n. 5, p. 474–478, 2015.

RUTHERFURD, S. M. Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in Hydrolysates: a review. **Journal of AOAC International**, v. 93, n. 5, p. 1515–1522, 2010.

SANCHUKI, H. B. S. et al. Conserved histidine residues at the ferroxidase centre of the *Campylobacter jejuni* Dps protein are not strictly required for metal binding and oxidation. **Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 156–63, 1 jan. 2016.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949–1956, 2010.

SCHÄGGER, H. Tricine-SDS-PAGE. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 16–22, 2006.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Bioactive peptides. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 4, p. 914–931, maio 2008.

SILVESTRE, M. P. C. et al. Degree of hydrolysis and peptide profile of whey proteins using pancreatin. **Brazilian Society on Food Nutrition**, v. 38, n. 3, p. 278–290, 2013.

SINDIAVIPAR. **Estatísticas: Abate de Frango**. Disponível em: <<https://www.sindiavipar.com.br/index.php?modulo=8&acao=detalhe&cod=1001>>. Acesso em: 23 jul. 2018.

SINGH, B. P.; VIJ, S.; HATI, S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v. 54, p. 171–179, 2014.

SORAPUKDEE, S.; NARUNATSOPANON, S. Comparative Study on Compositions and Functional Properties of Porcine, Chicken and Duck Blood. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 37, n. 2, p. 228–241, 30 abr. 2017.

SPELLMAN, D. et al. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 6, p. 447–453, 2003.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252–260, 2000.

STEINHARDT, J.; BEYCHOK, S. Interaction of Proteins with Hydrogen Ions and Other Small Ions and Molecules. In: NEURATH, H. (Ed.). **The Proteins: Composition, Structure, and Function**. 2. ed. New York, USA: Academic Press, 1964. p. 139–304.

SUN, Q. et al. Effects of pH, temperature and enzyme to substrate ratio on the antioxidant activity of porcine hemoglobin hydrolysate prepared with pepsin. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 44–61, 2011.

TADROS, T. F. Emulsion Formation, Stability, and Rheology. In: **Emulsion Formation and Stability**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013. p. 1–75.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1–11, 2013.

TEIXEIRA, G. L. et al. Sapucaia nut (*Lecythis pisonis* Cambess.) flour as a new industrial ingredient: Physicochemical, thermal, and functional properties. **Food Research International**, v. 109, n. May, p. 572–582, 2018.

THAIPHANIT, S.; SCHLEINING, G.; ANPRUNG, P. Effects of coconut (*Cocos nucifera* L.) protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis on the stability and rheological properties of oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 252–264, out. 2016.

TOLDRÀ, M. et al. Hemoglobin hydrolysates from porcine blood obtained through enzymatic hydrolysis assisted by high hydrostatic pressure processing. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 4, p. 435–442, 2011.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**, 2018.

VALTA, K. et al. Valorisation Opportunities Related to Wastewater and Animal By-Products Exploitation by the Greek Slaughtering Industry: Current Status and Future Potentials. **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, n. 5, p. 927–945, 2015.

VAN DER VEN, C. et al. Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and -stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 2938–2946, 2002.

VENTURA, R. **Mudanças no Perfil do Consumo no Brasil: Principais Tendências nos Próximos 20 Anos**. Rio de Janeiro: Macroplan – Prospectiva, Estratégia e Gestão, 2009. Disponível em: <<http://www.macroplan.com.br/documentos/artigomacroplan2009103018108.pdf>>.

WANG, B. et al. Double enzymatic hydrolysis preparation of heme from goose blood and microencapsulation to promote its stability and absorption. **Food Chemistry**, v. 217, p. 699–704, 2017.

WANG, J. et al. Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis. **Chemistry Central Journal**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2013.

WANG, L.; WU, M.; LIU, H. M. Emulsifying and physicochemical properties of soy hull hemicelluloses-soy protein isolate conjugates. **Carbohydrate Polymers**, v. 163, p. 181–190, 2017.

WUBSHET, S. G. et al. FTIR as a rapid tool for monitoring molecular weight distribution during enzymatic protein hydrolysis of food processing by-products. **Analytical Methods**, v. 9, n. 29, p. 4247–4254, 2017.

YOUSEFI, M.; ARIFFIN, F.; HUDA, N. An alternative source of type I collagen based on by-product with higher thermal stability. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 372–382, 2017.

ZAYAS, J. F. **Functionality of Proteins in Food**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1997.

ZENG, M. et al. Improving the Foaming Properties of Soy Protein Isolate Through Partial Enzymatic Hydrolysis. **Drying Technology**, v. 31, n. 13–14, p. 1545–1552, out. 2013.

ZHAO, Q. et al. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. **Food Chemistry**, v. 134, n. 3, p. 1360–1367, 2012.

ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I.; BETA, T. Multi-response optimization of phenolic antioxidants from white tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze) and their identification by LC-DAD-Q-TOF-MS/MS. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 897–907, 2016.

ZÜGE, L. C. B. et al. Catastrophic inversion and rheological behavior in soy lecithin and Tween 80 based food emulsions. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 1, p. 72–77, 2013.